

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kristiina Jalakas

**Pagaripärmi DNA replikatsiooni alguspunktide järjestuselementide mõju Forkhead1  
transkriptsioonifaktori seondumisele ja replikatsiooni alguspunktide ajastusele**

Magistritöö

Juhendajad

Professor Arnold Kristjuhan, *PhD*

Marko Lõoke, *PhD*

TARTU 2015

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 DNA replikatsiooni initsiatsioon eukarüootides .....	7
1.2 Pagaripärmi replikatsiooni alguspunktide struktuur .....	8
1.2.1 ARSi konsensusjärjestus .....	8
1.2.2 B-elementid .....	9
1.3 Pre-RC moodustumine replikatsiooni alguspunktile .....	10
1.3.1 ORC kompleks .....	11
1.3.2 Cdc6 ja Cdt1 .....	11
1.3.3 MCM kompleks .....	12
1.4 Pre-RC aktivatsioon .....	12
1.5 DNA replikatsiooni alguspunktide efektiivsus ja ajastus .....	14
1.5.1 Replikatsioonifaktorite limiteeriv hulk .....	16
1.5.2 Kromatiini struktuur .....	16
1.5.3 Histoonide atsetüleerimine .....	18
1.5.4 Forkhead transkriptsioonifaktorid .....	18
2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....	20
2.1 Töö eesmärgid .....	20
2.2 Materjal ja meetodika .....	20
2.2.1 Kasutatud söötmed .....	20
2.2.2 Kasutatud pärmitüved .....	21
2.2.3 Tüvede valmistamine .....	21
2.2.4 Kromatiini immuunsadestamine (ChIP) .....	23
2.2.5 Kvantitatiivne PCR (qPCR) .....	25
2.2.6 Rakutsükli analüüsimine läbivoolutsütomeetriga .....	26
2.2.7 DNA replitseerumise määramine .....	26
2.3 Tulemused .....	27
2.3.1 Fkh1 sidumise sõltuvus ACS järjestusest .....	28
2.3.2 Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelise kauguse mõju Fkh1 seondumisele .....	29
2.3.3 Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelise kauguse mõju <i>origin</i> 'ide ajastusele .....	32
2.4 Arutelu .....	35
KOKKUVÕTE .....	39
SUMMARY .....	40
TÄNUSÕNAD .....	42
KASUTATUD KIRJANDUS .....	43
LISAD .....	50
Lisa 1. Kasutatud pärmitüved .....	50
Lisa 2. Kromatiini immuunsadestamise katsete lahuste koostised .....	52
Lisa 3. qPCR-il kasutatud praimerid .....	53
Lisa 4. DNA replitseerumine HU-arrestitud AKY901-AKY909 tüvede rakkudes .....	54

## KASUTATUD LÜHENDID

5-FOA – 5-fluoro-orothape (*5-fluoroortic acid*)

ACS – ARSi konsensusjärjestus (*ARS consensus sequence*)

ARS – autonoomselt replitseeruv järjestus (*autonomously replicating sequence*)

Bar1 - *Barrier to the alpha factor response*

BSA – *bovine serum albumin*

Cdc45 – *Cell division cycle 45*

Cdc6 – *Cell division cycle 6*

CDK – tsükliin-sõltuv kinaas (*cyclin-dependent kinase*)

Cdt1 – *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*

ChIP - kromatiini immuunsadestamine (*chromatin immunoprecipitation*)

CMG – Cdc45-MCM-GINS kompleks

DDK – Dbf4-sõltuv kinaas (*Dbf4-dependent kinase*)

Dpb11 – *DNA polymerase B 11*

EACS – laiendatud ACS (*extended ACS*)

FHA – *Forkhead associated*

Fkh (FKH) – *Forkhead*

Fkh1/2 – *Forkhead homolog 1/2*

Gcn5 – *General control nonderepressible 5*

GINS – jpn *Go, Ichi, Ni, San* (5, 1, 2, 3)

HU – hüdroksüurea

Mcm10 – *Minichromosome maintenance 10*

MCM – Mcm2-7 valkudest koosnev kompleks (*minichromosome maintenance*)

NDR – nukleosoomidest vaba ala (*nucleosome depleted region*)

ORC – *origin*'i äratundev kompleks (*origin recognition complex*)

Pol $\alpha$   $\alpha/\delta/\epsilon$  – DNA polümeraas  $\alpha/\delta/\epsilon$

Pre-RC – pre-replikatiivne kompleks (*pre-replication complex*)

RPA – *Replication protein A*

RPD3 – *Reduced potassium dependency 3*

Sld2/3/7 – *Synthetically lethal with Dpb11 2/3/7*

ssDNA – üheaheelaline DNA (*single-stranded DNA*)

VPS13 – *Vacuolar protein sorting 13*

WCE – *whole cell extract*

YNB – *yeast nitrogen base*

YPD – *yeast extract, peptone, dextrose*

## SISSEJUHATUS

Rakkude jagunemine on organismi kasvamise, arenemise ja elus püsimise alus. Selle juures on oluline, et igas rakutsüklis toimuks DNA replikatsiooni abil kogu genoomi kahekordistumine. DNA replikatsiooni käigus saadakse ühest DNA molekulist kaks ühesuguse nukleotiidses järjestusega DNA molekuli ning need jagatakse võrdselt tütarrakkude vahel. DNA replikatsioon algab järjestustelt, mida nimetatakse replikatsiooni alguspunktideks ehk *origin*'ideks. Need on DNA piirkonnad, kuhu seotakse kindlas järjekorras replikatsiooni initsiatsiooniks vajalikud valgud. Järgnevalt toimub tekkinud valkkompleksi aktiveerimine.

Eukarüootide genoomis on replikatsiooni alguspunkte palju ning nende aktiveerimine toimub S-faasis erinevatel aegadel. Replikatsiooni alguspunktide aktiveerimise ajalise kontrolli täpne mehhanism ei ole teada. Kui rakkudele iseloomulik *origin*'ide aktiveerumise muster on aga häiritud, võib juhtuda, et need ei suuda oma genoomi õigeaegselt kahekordistada või duplitseeritakse mõni piirkond mitmekordselt. See põhjustab genoomi ebastabiilsust ning võib kõrgemates eukarüootides viia vähkkasvajate tekkeni. Järelikult on vaja teha kindlaks, millised tegurid määravad replikatsiooni alguspunktide ajastuse.

On teada, et mõningate replikatsioonifaktorite hulk rakkudes on väikesem, kui replikatsiooni alguspunktide arv ning seetõttu ei ole võimalik replikatsiooni kõikidelt alguspunktidelt üheaegselt alustada. Mis põhjustab replikatsioonifaktorite eelistatud seondumist kindlate *origin*'idega, vajab veel selgitust. Enamike alguspunktide ajastuse määramisel mängib rolli neid ümbritsev kromatiini kontekst. Kuna replikatsiooni alguspunktidega seonduvad suured valkkompleksid, on eelisjärjekorras avatud kromatiini struktuuriga alad.

Peale selle on näidatud, et teatud replikatsiooni alguspunktide ajastust mõjutavad nende lähedusse seonduvad transkriptsioonifaktorid. Üheks näiteks on Forkhead (Fkh) perekonna valgud, mille seondumiskohad esinevad mitmete varajaste *origin*'ide järjestustes. Fkh valkude seondumine DNAGA ei sõltu aga ainult konsensusjärjestuse olemasolust. Arvatakse, et nende sidumiseks on vaja mitut teineteise lähedal asuvat konsensusjärjestust. Samuti võib olla oluline Fkh faktorite interakteerumine teiste valkudega. Forkhead faktorite toimemehhanism DNA replikatsiooni ajastuse määramisel ning tingimused replikatsiooni alguspunktidega seondumiseks ei ole veel selged.

Käesoleva töö teoreetilises osas antakse ülevaade eukarüootsest DNA replikatsiooni initsiatsioonist, pagaripärmi replikatsiooni alguspunktidest ning DNA replikatsiooni ajastust ja efektiivsust määravatest teguritest. Töö eksperimentaalses peatükis kirjeldatakse pagaripärmi näitel, millised *origin*'ide järjestuselemendid on olulised Forkhead transkriptsioonifaktorite sidumiseks. Täpsemalt, kas Forkhead1 valgu seondumine sõltub pagaripärmi replikatsiooni alguspunkte defineerivast järjestusest. Samuti, kas kahe Fkh konsensusjärjestuse omavaheline kaugus mõjutab Forkhead1 valgu seondumist *origin*'i DNAGA.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 DNA replikatsiooni initsiatsioon eukarüootides

Enne jagunemist peavad rakud kogu oma geneetilise materjali kahekordistama ehk replitseerima ning see on aluseks bioloogilisele põlvnemisele nii pro- kui ka eukarüootides. DNA replikatsiooni põhimehhanism on evolutsiooniliselt konserveerunud. See toimub kõikides organismides semikonservatiivse mehhanismi alusel: iga uus DNA kaksikahel sisaldab ühte vana ahelat ning sellega komplemetaarset vastsünteesitud ahelat (Meselson & Stahl, 1958; Bell & Dutta, 2002). Eukarüootide genoom on aga märgatavalt suurem ja keerulisema struktuuriga kui prokarüootide oma. Sellest tulenevalt on ka DNA replikatsiooni regulatsioon neis oluliselt mitmekülgsem (Bell & Dutta, 2002; Masai et al., 2010).

DNA replikatsiooni alustatakse replikatsiooni alguspunktidelt ehk *origin*'idelt. Need on genoomi piirkonnad, kuhu seonduvad kindlas järjekorras DNA replikatsiooni initsiatsiooniks vajalikud valgud (Marahrens & Stillman, 1992). Eukarüootide genoomis on replikatsiooni alguspunkte palju ning nende aktiveerimine toimub DNA sünteesi faasis (S-faas) erinevatel aegadel (Takahashi, 1987). Et igas rakutsüklis toimuks kogu genoomi vigadeta kahekordistumine, peab DNA replikatsiooni kulg olema rakkudes süsteemselt kontrollitud.

Üheks DNA replikatsiooni initsiatsiooni kontrollmehhanismiks on selle jaotumine kahte etappi. Esiteks toimub *origin*'ide litsentsimine (ingl *licensing*) ehk pre-replikatiivse kompleksi (pre-RC, ingl *pre-replication complex*) seondumine replikatsiooni alguspunktidega. See toimub kõikide *origin*'ide puhul mitoosi lõpus või G1-faasis. Teises etapis aktiveeritakse pre-replikatiivne kompleks ning moodustuvad kaks erinevas suunas liikuvat replikatsioonikahvlit. Erinevaid *origin*'e aktiveeritakse kogu S-faasi vältel kuni kõik genoomi piirkonnad on kahekordistunud (Bell & Dutta, 2002; Masai et al., 2010).

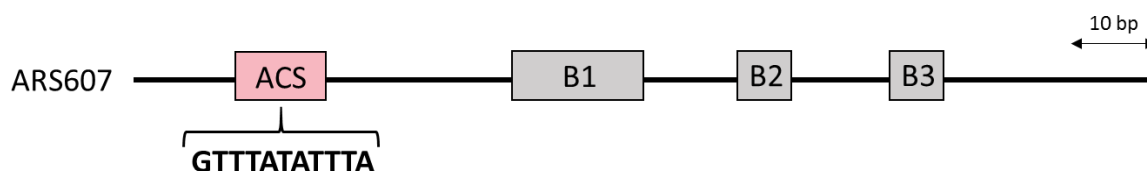
DNA replikatsiooni ajalise ja ruumilise toimumise aspektid on viimastel aastatel saanud järjest enam tähelepanu. On välja pakutud teooria, et DNA replikatsioon toimub nn replikatsioonivabrikutes, mis paiknevad tuuma piirkondades, kus on ümbritsevatest aladest suurem replikatsioonifaktorite kontsentratsioon. Sinna tuuakse füüsiliselt kokku mitmed replikatsiooni alguspunktid. Sellised struktuurid on dünaamilise iseloomuga ning

moodustuvad ja lagunevad S-faasi jooksul tänu erinevate *origin*'ide aktiveerumisele erinevatel aegadel (Knott et al., 2012; Leonhardt et al., 2000).

DNA replikatsiooni regulatsiooni ning selle toimumise erinevaid etappe uuritakse põhiliselt üherakulise mudelorganismi, pagaripärmi (*Saccharomyces cerevisiae*), abil. *S. cerevisiae*' eeliseks on see, et erinevalt teistest eukarüootidest, on tema replikatsiooni alguspunktide asukohad kromosoomidel üle kogu genoomi kaardistatud ning erinevate alguspunktide aktiveerumise aeg kindlaks tehtud (Raghuraman et al., 2001; Yabuki et al., 2002).

## 1.2 Pagaripärmi replikatsiooni alguspunktide struktuur

Pagaripärmi DNA replikatsiooni alguspunkte nimetatakse autonoomselt replitseeruvateks järjestusteks (ARS, ingl *autonomously replicating sequence*), sest plasmiidid, mis neid järjestusi sisaldavad, on võimelised ilma genoomi integreerumata replitseeruma (Stinchcomb et al., 1979). Pagaripärmi genoomis paiknevad ARS järjestused enamasti geenidevahelistes alades (Wyrick et al., 2001). ARS elemendid on mõnesaja aluspaari pikkused ning sisaldavad replikatsiooni initsieerimiseks hädavajalikku A-domeeni ning initsiatsiooni toimumist toetavaid B-domeene (Joonis 1) (Celniker et al., 1984).



**Joonis 1. Pagaripärmi replikatsiooni alguspunkti ARS607 struktuur.** Välja on toodud ARS607 tähtsamate järjestuselementide ligikaudne paiknemine. A-domeen on tähistatud nimega ACS, sest see on domeeni keskne element, lisatud on ARS607 ACSi nukleotiidne järjestus (Chang et al., 2011, modifitseeritud).

### 1.2.1 ARSi konsensusjärjestus

A-domeenis paikneb konserveerunud ARSi konsensusjärjestus ehk ACS (ingl *ARS consensus sequence*). See on 11 aluspaari pikkune AT-rikas järjestus, mille struktuur on järgnev:



(T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A). ACSiga seondub *origin*'i äratundev kompleks (ORC, ingl *origin recognition complex*), mis on esimene pre-RC komponent. On näidatud, et varieeruvused teatud ACSi nukleotiidides on lubatud, kuid mõnede nukleotiidide erinemine konsensusest kahjustab oluliselt *origin*'i funktsionaalsust (Bell & Stillman, 1992; Van Houten & Newlon 1990).

Lisaks on ARSide võrdlevas analüüsis leitud veel kolm konserveerunud nukleotiidi ACSi mõlemas otsas. Seda järjestust nimetatakse laiendatud ACSiks (EACS, ingl *extended ACS*). Külgnevad nukleotiidid on vähem konserveerunud kui ACS ise, kuid esinevad pagaripärmi *origin*'ides siiski suure sagedusega ning võivad olla olulised ORC kompleksi stabiilseks sidumiseks (Theis & Newlon, 1997; Chang et al., 2011).

Kuigi ARSi konsensusjärjestus on *origin*'i funktsioneerimise eelduseks, ei ole see replikatsiooni initsieerimiseks piisav. *S. cerevisiae*' genoomis on tuhandeid ACS elemente, kuid ainult umbes 400 neist asuvad replikatsiooni alguspunktides (Nieduszynski et al, 2006). Peale selle leidub ka ARSe, mis võimaldavad küll plasmiidide replitseerumist, kuid ei tööta oma looduslikes lookustes *origin*'idena (Dubey et al., 1991). Järelikult on DNA replikatsiooni algatamisel olulised ka ACSi ümbritsevad alad ja nende struktuur.

### 1.2.2 B-elementid

Lisaks ACSile on pagaripärmi *origin*'ide struktuuris eristatud mitmeid B-elemente. Nende nukleotiidne järjestus ja funktsioon varieeruvad aga erinevate DNA replikatsiooni alguspunktide puhul (Dhar et al., 2012). Enim on kirjeldatud B1-domeeni, mis aitab kaasa ORCi stabiilsele seondumisele replikatsiooni alguspunktidega (Rao & Stillman, 1995).

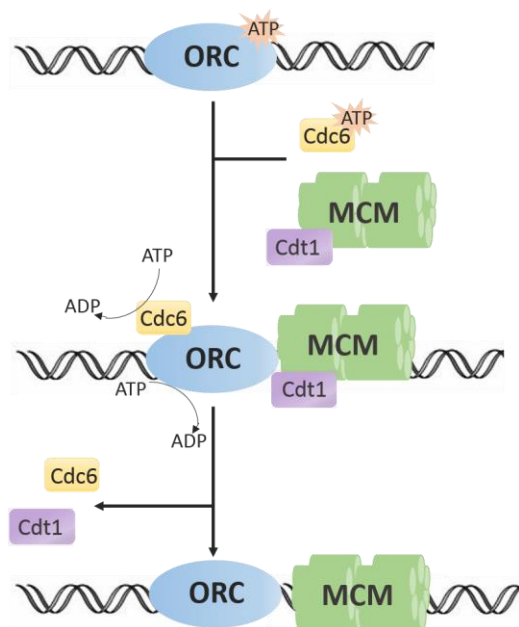
ACSi ümbritsevateelementide üheks rollis on hõlbustada replikatsiooniks vajalikku DNA lahtikeerdumist (Umek et al., 1988). Tihti sisaldavad need ka DNA replikatsiooni soodustavate transkriptsioonifaktorite seondumiskohti (Diffley & Stillman, 1988). Teatud transkriptsioonifaktorite sidumine võib aidata kaasa kromatiini remodelleerimisele või modifitseerimisele nii, et olulised *origin*'i järjestused jääksid nukleosoomivabasse piirkonda. (Venditti et al, 1994). See on replikatsiooni toimumiseks oluline, kuna nii muudetakse *origin*'id replikatsioonifaktoritele ligipääsetavaks. Näiteks histoonide atsetüleerimine

soodustab *origin*'ide aktivatsiooni just tänu avatud kromatiini struktuuri tekkimisele (Vogelauer et al, 2002).

Seega mõjutavad ARS järjestuste funktsionaalsust mitmed elemendid, kuid nende kõigi eesmärk on tagada *origin*'ide piirkonnas sobivad tingimused replikatsioonifaktorite sidumiseks ja järgnevate iniitsiatsiooniprotsesside toimumiseks.

### 1.3 Pre-RC moodustumine replikatsiooni alguspunktidele

DNA replikatsiooni iniitsiatsiooni esimene etapp on pre-replikatiivse kompleksi (pre-RC) moodustumine. See leiab aset lühikese perioodi jooksul mitoosi lõpust kuni G1-faasi lõpuni (Piatti et al., 1996). Pre-RC teke peatab MCM (ingl *minichromosome maintenance*) kompleksi laadimisega replikatsiooni alguspunktidele. Esmalt seondub ACSiga aga kuuesubühikuline ORC kompleks. Lisaks osalevad MCMi sidumisel kofaktorid Cdc6 (ingl *Cell division cycle 6*) ja Cdt1 (ingl *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*). Pre-RC moodustumiseks on oluline ka kompleksi valkude võime ATPd siduda ja hüdrolüüsida (Joonis 2) (Remus et al., 2009).



**Joonis 2. Pre-replikatiivse kompleksi moodustumine.** ORC kompleks seondub kõikide replikatsiooni alguspunktidega. Mitoosi lõpus/G1-faasis laetakse *origin*'idele Cdc6 ja Cdt1-ga seotud MCM kompleks. Cdc6 ja ORCi subühikud hüdrolüüsivad ATPd, sellele järgneb Cdt1 ja Cdc6 dissotsieerumine kompleksist ning MCMi seondumine ümber kaheaahelise DNA.

### 1.3.1 ORC kompleks

ORC ehk *origin*'i äratundev kompleks eraldati esimesena pagaripärmist ning identifitseeriti valkkompleksina, mis seondub spetsiifiliselt replikatsiooni alguspunktide ACS järjestusega ning on otseselt seotud *origin*'i funktsionaalsusega. See tähendab, et ORC märgib genoomis ära potentsiaalsed DNA replikatsiooni alguspunktid ja see on eelduseks järgnevate initsiatsioonifaktorite seondumiseks (Bell & Stillman, 1992).

ORC koosneb kuuest subühikust, mida nimetatakse vastavalt nende suurusele (kahanevas järjekorras) Orc1-Orc6, kompleksi kogumass on 412 kDa (Bell & Stillman, 1992; Chen et al., 2008). Orc1 ja Orc5 subühikud seovad ORC-DNA interaktsiooniks vajalikku ATPd. Orc1 on võimeline ATPd ka hüdrolyüsima, kuid see toimub alles pärast kompleksi seondumist DNAGA (Klemm et al., 1997). Orc1-5 vastutavad kogu kompleksi DNAGA assotsieerumise eest. Kuigi Orc6 otseselt DNAd ei seo, on see replikatsiooni toimumiseks ja rakkude elulisuseks siiski vajalik (Lee & Bell, 1997).

### 1.3.2 Cdc6 ja Cdt1

Cdc6 ja Cdt1 valkude põhiülesandeks on aidata MCM kompleksi replikatsiooni alguspunktile laadida. Kui kuuesubühikuline ORC on *origin*'idele kinnitunud, liitub sellega ATPga seotud Cdc6. Cdt1 koos MCMiga seondub omakorda eelnevalt moodustunud ORC-Cdc6 kompleksiga (Remus et al., 2009).

Järgnevalt toimub Cdc6 ja ORC valkudega seotud ATP hüdrolyüs. See stimuleerib Cdt1 ja Cdc6 dissotsieerumise kompleksist ja sellele järgneb MCMi paigutumine ümber kaheaheelise DNA (Joonis 2). Kui aga mõni pre-RC komponent on kompleksist puudu või esineb vales konformatsioonis, järgneb ATP hüdrolyüsile kogu defektse pre-RC eemaldamine (Frigola et al., 2013; Randell et al., 2006).

### 1.3.3 MCM kompleks

MCM on kuuesubühikuline kompleks, mis koosneb eukarüootsetes organismides konserveerunud Mcm2-7 valkudest. Kõik need valgud on ATPaasse aktiivsusega ja osalevad nii DNA replikatsiooni initsiatsioonil kui ka elongatsioonil (Aparicio et al., 1997).

Replikatsiooni alguspunktide litsentsimise käigus laetakse *origin*'idele kaks MCMi heksameeri. Mõlemad neist seonduvad ORC-Cdc6 kompleksiga Mcm3 subühiku C-terminaalse otsa kaudu (Frigola et al., 2013). Tänu ATP hüdrolyüsamisele tekib rõngakujulise MCM heksameeri Mcm2 ja Mcm5 subühikute vahele avaus. Selle n-õ vārava avanemine ja sulgumine võimaldab kompleksi laadimist ümber kaheaheelalise DNA (Bochman & Schwacha, 2008). Kaks heksameeri paigutatakse üksteise suhtes „pea-pea“ (ingl *head-to-head*) konformatsioonis ning DNA läbib selle kompleksi tsentraalset kanalit (Remus et al., 2009).

G1-faasis on rakutuumas MCM komplekse oluliselt rohkem kui replikatsiooni alguspunkte ja nendega seonduvat ORCi. (Lei et al., 1996). Mcm2-7 heksameeride seondumine kromatiiniga sõltub pre-RC komponentidest, G1-/S-faasi üleminekul paigutatakse need aga üle kogu genoomi laiali (Powell et al., 2015). Arvatakse, et MCM valkude suurem hulk võimaldab replikatiivse stressi korral väheefektiivsete *origin*'ide aktiveerimist ja kindlustab sellega DNA replikatsiooni lõpuleviimise (Ibarra et al, 2008; Powell et al., 2015).

## 1.4 Pre-RC aktivatsioon

Kuigi pre-RC on *origin*'idele moodustunud juba G1-faasi lõpuks, on DNA replikatsiooni initsiatsioon siis veel inhibeeritud. S-faasi sisenemisel tõuseb rakkudes erinevaid replikatsioonifaktoreid fosforüleerivate kinaaside, CDK (tsükliin-sõltuv kinaas, ingl *cyclin-dependent kinase*) ja DDK (Dbf4-sõltuv kinaas, ingl *Dbf4-dependent kinase*), aktiivsus ning see püsib kõrgena kuni mitoosi lõppfaasideni (Zou & Stillman, 2000).

CDK põhilisteks substraatideks on replikatsioonifaktorid Sld2 (ingl *Synthetically lethal with Dpb11* 2) ja Sld3/7. Fosfaatrühma lisamine kindlatele aminohapetele tekitab nendes valkudes soodsad seondumiskohad Dpb11 (ingl *DNA polymerase B 11*) jaoks ja võimaldab edasist

replikatsioonikompleksi moodustumist (Joonis 3) (Tanaka et al., 2007; Tanaka et al., 2011). Samal ajal kindlustab CDK aktiivsuse tõus replikatsiooni ühekordse toimumise. ORCi, Cdc6 ja MCMi fosforüleerimisega takistatakse läbi erinevate mehhanismide uute pre-RC-de moodustumist S-faasi käigus (Nguyen et al., 2001).

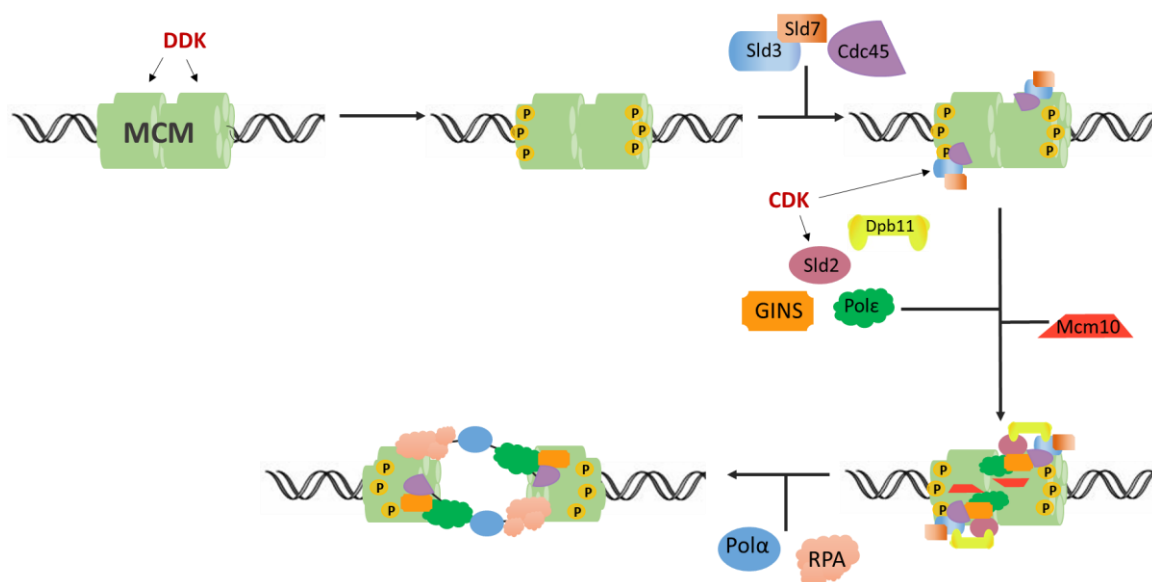
DDK fosforüleerib erinevaid Mcm2-7 subühikuid, peamised sihtmärgid on Mcm4, Mcm2 ja Mcm6. Mcm4 fosforüleerides eemaldatakse selle inhibitoorne mõju helikaasi aktivatsioonile (Sheu & Stillman, 2010). Mcm2 fosforüleerimisega indutseeritakse kaheaahelalist DNAd ümbritseva MCM kompleksi Mcm2-5 värava avanemine. See võimaldab üheaahelalise DNA väljumist MCMi rõngast ning soodustab aktiivse helikaasi moodustumist (Bruck & Kaplan, 2014). Lisaks osaleb DDK replikatsiooni seiskumise korral S-faasi sisese kontrollpunkti käivitamisel (Sheu & Stillman, 2010).

CDK substraatide (Sld2 ja Sld3/7) fosforüleerimine ja Dbp11 liitumine nende valkudega on kokkuvõtteks vajalik CMG (Cdc45-MCM-GINS) moodustumiseks ja aktivatsiooniks (Tanaka et al., 2007; Yeeles et al., 2015). CMG on DNA replikatsioonis aktiivne helikaas, sellesse kuuluvad Cdc45 (ingl *Cell division cycle 45*), Mcm2-7 ja GINS (jpn *Go, Ichi, Ni, San*) kompleks (Joonis 3) (Moyer et al., 2006). Cdc45 sidumise eest vastutab Sld3 (Kamimura et al., 2001). Pärast üheaahelalise DNA (ssDNA, ingl *single-stranded DNA*) väljumist helikaasi tsentrist, dissotsieeruvad Sld2, Sld3/7 ja Dpb11 kompleksist ning see võimaldab GINSi otsest seondumist Cdc45-MCMga. Sel viisi on kontrollitud CMG moodustumine õigel ajal õiges kohas, ümbritsedes ssDNAd (Dhingra et al., 2015).

Tänu ATPaassele olemusele on MCM küll replikatiivse helikaasi „mootor“, kuid kolmikkompleksi tekkega tõuseb selle võime ATPd hüdrolyüsida märgatavalt. CMG afiinsus DNA suhtes on oluliselt suurem kui MCMil eraldiseisvalt ning selle helikaasne aktiivsus on kõrge (Ilves et al., 2010). CMG aktivatsiooniks on vajalik DNA polümeraas  $\epsilon$  ja Mcm10 (ingl *Minichromosome maintenance 10*) seondumine replisoomiga (Joonis 3) (Yeeles et al., 2015). On näidatud, et Mcm10 puudumise korral CMG küll moodustub, kuid selline kompleks on inaktiivne (Watase et al., 2012; Yeeles et al., 2015). Lisaks aitab Mcm10 DNA polümeraas  $\alpha$  (Pol $\alpha$ ) *origin'*idele laadida ning selle katalüütilist domeeni stabiliseerida (Ricke & Bielinsky, 2004).

CMG helikaasi töö tulemusena keeratakse kaheaahelalise DNA ahelad üksteisest lahku. Tekkinud üheaahelalistele DNA lõikudele kinnitub replikatsioonivalk A (RPA, ingl *Replication protein A*). RPA sidumisega stabiliseeritakse ssDNA, see võimaldab DNA edasist

lahtikeerdumist ning on eelduseks uute ahelate sünteesi alustamiseks Pol $\alpha$  poolt (Joonis 3) (Tanaka & Nasmyth, 1998). DNA replikatsiooni elongatsiooni viivad eukarüootides läbi kolm DNA polümeraasi. Polümeraas  $\alpha$  primaasi domeeni abil sünteesitakse uute DNA ahelate sünteesi alustamiseks vajalikud RNA-praimerid. Pol $\epsilon$  ja Pol $\delta$  vastutavad vastavalt juhtiva ja mahajääva ahela pikenemise eest (Burgers et al., 2009).



**Joonis 3. Pre-RC aktivatsioon.** S-faasi alguses tõuseb rakkudes DDK ja CDK kinaaside hulk. DDK fosforüleerib MCMi subühikuid, CDK substraadid on Sld2 ja Sld3/7. Sld3 ja Sld2 fosforüleerimisega tekivad neile sobivad seondumiskohad Dpb11 jaoks. Sld3 on vajalik Cdc45 laadimiseks MCMile. Järgneb GINSi, Pol $\epsilon$  ja Mcm10 valkude seondumine kompleksi valkudega. GINSi interaktsioon MCMiga on aga esialgu inhibeeritud, see toimub pärast Sld2, Sld3 ja Dpb11 kompleksist lahkumist. Mcm10 on vajalik Pol $\alpha$  seondumiseks replisoomiga. Replikatsiooni initsiatsioonil tekkinud üheaheelalise DNA stabiliseerimiseks seondub sellega RPA.

## 1.5 DNA replikatsiooni alguspunktide efektiivsus ja ajastus

Igat replikatsiooni alguspunkti saab iseloomustada kahe omaduse, efektiivsuse ja ajastuse, kaudu. *Origin*'i efektiivsus tähendab selle aktiveerimise sagedust rakupopulatsioonis ning ajastus iseloomustab sellest lähtuva DNA replikatsiooni algusaega S-faasis (Friedman et al., 1997).

Efektiivsetelt replikatsiooni alguspunktidelt alustatakse DNA kahekordistumist pea igas rakutsüklis, kuid leidub ka palju *origin*'e, mida aktiveeritakse vaid erandlikel juhtudel.

Sellegipoolest moodustub ka nendele alguspunktidele G1-faasis pre-replikatiivne kompleks (Friedman et al., 1997; Santocanale et al., 1999). Arvutuste abil on leitud, et mida suurem on litsentsitud replikatsiooni alguspunktide arv, seda vähem tekib S-faasi käigus replikatsioonikahvli seiskumisest tingitud vigasid (Blow & Ge, 2009). Üks genoomi terviklikkuse säilitamise mehhanisme replikatiivse stressi korral on passiivsete replikatsiooni alguspunktide aktiveerimine (Santocanale et al., 1999). Juba *origin*'iga seotud pre-RC aktiveerimine nõuab oluliselt vähem ressursi, kui kogu replikatsioonikompleksi kokkupanek. Seega on ühtlaselt jaotunud replikatsiooni alguspunktide olemasolu genoomis kasulik, isegi kui enamikku neist tavaolukorras ei aktiveerita (Blow & Ge, 2009).

DNA kahekordistumine saab alata pärast replikatiivse helikaasi aktiveerimist. Pagaripärmis laetakse MCMi tööks olulised kofaktorid, Sld3 ja Cdc45, varajastele alguspunktidele juba G1-faasi lõpus, hilistele alles S-faasis. Järelikult pannakse *origin*'ide ajastus paika kohe pärast pre-RC moodustumist G1-faasis (Kamimura et al., 2001).

Pagaripärmis on varajased ja efektiivsed *origin*'id näiteks ARS305 ja ARS607. Need töötavad enamjaolt igas rakutsüklis ning alati S-faasi alguses. ARS501 on küll efektiivne, kuid selle aktivatsioon on hiline. Paljudelt ARSidelt alustatakse DNA replikatsiooni S-faasi keskel. Seega toimub DNA sünteesi faasi vältel erinevate *origin*'ide järjestikune aktivatsioon ning see tagab kogu genoomi veatu duplikatsiooni (Raghuraman et al., 2001).

Replikatsiooni alguspunktide ajastus ja efektiivsus ei sõltu üksteisest küll täielikult, kuid enamikul juhtudel kehtib seos, et varased *origin*'id on efektiivsemad kui hilised (Yang et al., 2010). Üks hiliste alguspunktide madala efektiivsuse põhjuseid on nende asukoht varajaste *origin*'ide läheduses. Sellisel juhul toimub suure tõenäosusega hilise *origin*'i DNA passiivne replitseerumine ning selle enda aktivatsioon on genoomi stabiilsuse säilitamise huvides takistatud (Santocanale et al., 1999).

Kuigi DNA replikatsiooni alguspunktide ajastust kontrollivad mehhanismid ei ole veel täielikult selged, on leitud mitmeid aspekte, mis on selle määramisel olulise kaaluga.

### 1.5.1 Replikatsioonifaktorite limiteeriv hulk

DNA replikatsiooni initsiatsioonil seondub *origin*'i DNAGA üksteisest sõltuvalt suur hulk replikatsioonifaktoreid (ptk 1.3; 1.4). Pagaripärmi rakkudes on CDK substraatide (Sld2, Sld3) ja nendega seonduva Dpb11 kogus limiteeritud. Samuti on Dbf4, Sld7 ja Cdc45 hulk rakkudes väikesem, kui oleks vajalik kõikide *origin*'ide üheaegseks aktivatsiooniks. Kui aga limiteerivate replikatsioonifaktorite hulka suurendada, muutuvad mitmed tavapäraselt hilised *origin*'id varaselt aktiveeruvateks (Mantiero et al., 2011; Tanaka et al., 2011).

Nende tulemuste põhjal võib arvata, et normaalses rakutsükli seotakse G1-faasi käigus replikatsiooni initsiatsiooni valgud (eesotsas Sld3/7 ja Cdc45) esmalt kõrge afiinsusega *origin*'idele ning see võimaldab nende aktivatsiooni varases S-faasis. Pärast seda eralduvad enamik initsiatsioonifaktoreid kompleksist ning need saavad seonduda hilisema ajastusega replikatsiooni alguspunktidega. Selline replikatsioonifaktorite taaskasutus kestab kuni kogu genoom on replitseeritud ning kõik *origin*'id uuesti inaktiveeritud. Erinevalt teistest, ei saa Cdc45 valku aga taaskasutada enne kui replisoom on termineeritud, kuna see on integraalne helikaasi osa ning vajalik ka replikatsiooni elongatsioonil. (Mantiero et al., 2011; Tanaka et al., 2011).

Oluliseks küsimuseks jääb aga see, miks on mõned replikatsiooni alguspunktid limiteerivate initsiatsioonifaktorite suhes afiinsemad kui teised, või teisisõnu, miks on nende aktiveerumise tõenäosus keskmisest suurem.

### 1.5.2 Kromatiini struktuur

Kõikide rakutuumas toimuvate protsesside kontrollis on olulisel kohal kromatiini kontekst. DNA pakkimine nukleosoomidesse, histoonide modifikatsioonid ja kõrgemat järku kromatiini struktuuride moodustumine mõjutavad DNA kättesaadavust ja määravad muuhulgas ka teatud genoomi piirkondade replikatsiooni ajastuse. *Origin*'e ümbritseva kromatiini struktuuri tähtsust nende efektiivuse määramisel ilmestab see, et leidub ARS elemente, mis suudavad küll plasmidi paljundada, kuid ei käitu replikatsiooni alguspunktina oma looduslikus genoomi piirkonnas (Bell & Dutta, 2002; Dubey et al., 1991).



*Origin*'ide ümbruses nukleosoomide kaardistades on leitud, et ACS järjestused asuvad nukleosoomidest vabades alades (NDR, ingl *nucleosome depleted region*) ning neid ümbritsevad asümmeetriliselt positsioneeritud nukleosoomid. Nukleosoomide paiknemine kindlal kaugusel mõjutab replikatsiooni alguspunktide funktsionaalsust ning on tarvilik pre-RC sidumiseks. Piisava ulatusega NDRi säilitamine sõltub omakorda ORCi seondumisest *origin*'ide DNAGA (Eaton et al., 2010; Lipford & Bell, 2001). Mõningad replikatsiooni alguspunktid, sealhulgas ARS1, seovad Abf1 (ingl *ARS-binding factor 1*) transkriptsioonifaktorit. Abf1 aitab lisaks ORCile kaasa stabiilsele nukleosoomide paigutamisele ACSi ümber (Venditti et al., 1994).

Pagaripärmi replikatsiooni alguspunktide võrdlev analüüs on näidanud, et kuigi ACSi paiknemine nukleosoomidest vabas piirkonnas (~130-195 bp) on enamiku ARSide ühine omadus, on varajaste alguspunktide puhul NDR laiem. Lisaks on varajastes *origin*'ides ACSi ümbritsevad nukleosoomid kindlamalt positsioneeritud kui hiliste puhul (Soriano et al., 2014).

Kehtib üldisne seaduspärasus, et eukromatiini ehk avatud kromatiini struktuuriga alad replitseeruvad varases S-faasis, heterokromatiiniga kaetud DNA kahekordistatakse aga S-faasi lõpus (Karnani et al., 2007). Heaks näiteks on telomeeri piirkonnad kromosoomide otstes. Telomeeride DNA on genoomi stabiilsuse säilitamise tagamiseks tihedalt kokku pakitud ning moodustunud heterokromatiini tõttu toimub selle kahekordistumine hilises S-faasis. (Raghuraman et al., 2001). Kui kloneerida hiliselt aktiveeruv telomeeri piirkonnas asuv ARS501 teistsuguse kromatiini ehitusega lookusesse, muutub selle aktivatsiooniaeg varajasemaks (Ferguson & Fangman, 1992). Peale selle, kui viia varaselt aktiveeruv ARS1 hiliselt replitseeruva *origin*'i lähedusse, mis sealjuures ei ole telomeerse positsiooniga, muutub ka ARS1 aktivatsioon oluliselt hilisemaks. (Friedman et al., 1996). See tähendab, et telomeeride piirkonnad ei ole ainsad hilise replikatsiooni aktivatsiooni determinandid. Sarnaselt on replikatsiooni alguspunktide ajastuse sõltuvust positsioonist ja ümbritsevast kromatiini kontekstist näidatud ka mitmeid teisi *origin*'e genoomis ümber paigutades (Lööke et al., 2013).

### 1.5.3 Histoonide atsetüleerimine

Kromatiini struktuuris mängivad olulist rolli histoonide modifikatsioonid. Näiteks histoonide atsetüleerimine nõrgestab sidemeid DNA ja histoonide vahel ning see muudab DNA valkudele rohkem kättesaadavaks (Lee et al., 1993). *RPD3* (ingl *Reduced potassium dependency 3*) geen kodeerib histoonide deatsetülaasi ning selle geeni deleteerimine põhjustab laiaulatuslikumat histoonide atsetüleerimist, sealhulgas ka *origin*'ide piirkonnas. Rpd3 deatsetülaasi deletsioon indutseerib mitmete tavapärase olukorras hiliste *origin*'ide muutumist varajasemaks ning soodustab sellega ka kogu genoomi kiiremat kahekordistumist (Aparicio et al., 2004; Vogelauer et al., 2002; Knott et al., 2009).

Replikatsiooni ajastuse muutus sõltuvalt histoonide atsetüleerimise tasemest loob teatava seose DNA replikatsiooni ajastuse ning geeniregulatsiooni vahel, sest histoonide atsetüleerimine soodustab nii varajast replikatsiooni ajastust kui ka aktiivset transkriptsiooni (Knott et al., 2009). Nii pagaripärmis, poolduvas pärmis kui ka inimese rakkudes replitseeruvad S-faasi ajal aktiivselt transkribeeritavad piirkonnad esimesena ning transkriptsiooniliselt represseritud alad hiljem (Fraser, 2013).

Histoonide atsetüleerimise taseme olulisust DNA replikatsiooni alguspunktide ajastuse kontrollis on tõestatud ka histoonide atsetüültransferaaside aktiivsust tõstes. Indutseeritud Gcn5 (ingl *General control nonderepressible 5*) atsetüültransferaasi töö hiliste *origin*'ide läheduses muudab nende aktivatsiooniaega 10-15 minutit varasemaks. (Vogelauer et al., 2002). Siiski ei aktiveeru hilised alguspunktid ka histoonide lokaalse atsetüleerimise korral nii vara kui genoomi looduslikult varaseimad *origin*'id. See on andnud alust arvata, et leidub tegureid, mis vastutavad otseselt just S-faasi alguses toimuva replikatsiooni aktivatsiooni eest (Aparicio, 2013).

### 1.5.4 Forkhead transkriptsioonifaktorid

Rpd3 deatsetülaasi aktiivsusest sõltub pagaripärmis umbes saja replikatsiooni alguspunkti hiline ajastus. Rpd3-sõltuvate *origin*'ide nukleotiidseid järjestusi analüüsides täheldati, et neis ei esine tuntud rakutsükli kontrollis osalevate transkriptsioonifaktorite, Fkh1 (ingl *Forkhead homolog 1*) ja Fkh2, konsensusjärjestusi. Vastukaaluks leiti grupp varajasi replikatsiooni

alguspunkte, mille ACSi läheduses on Fkh1/2 seondumiskohad ning mille ajastus sõltub nende faktorite seondumisest (Knott et al., 2012; Zhu et al., 2000).

Fkh1/2 faktorid kontrollivad pagaripärmis CLB2 klastrisse kuuluvate geenide transkriptsiooni G2-/M-faasi üleminekul (Zhu et al., 2000). Nende roll *origin*'ide aktivatsiooniaja määramisel on aga ilmselt transkriptsioonist sõltumatu. Transkriptsiooni regulatsioonis osaleb põhiliselt Forkhead2, DNA replikatsiooni kontrollis aga Forkhead1 (Knott et al., 2012). Fkh1 ja Fkh2 valgud sisaldavad konserveerunud DNAd siduvat FKH (ingl *forkhead*) domeeni, Forkhead faktoritele iseloomulikku FHA (ingl *forkhead associated*) domeeni ning erinevad teineteisest vaid C-terminaalse otsa poolest. Fkh1/2 seondumiseks vajalik konsensusjärjestus DNAl on (A/G)TAAA(C/T)A (Badis et al., 2008; Murakami et al., 2010).

Fkh1/2 seondumiskohti sisaldavad näiteks pagaripärmi replikatsiooni alguspunktid ARS305, ARS737 ja ARS607. Need *origin*'id säilitavad oma varajase ajastuse isegi siis, kui need paigutada looduslikult hiliselt replitseeruvasse genoomi piirkonda. Kui aga deleteerida rakkudest Fkh faktorid või muteerida alguspunktides Fkh1/2 siduvad järjestused, muutuvad antud *origin*'id hilisteks. See tähendab, et replikatsiooni ajastuse määravad nende ARSide järjestuselemendid, mitte ümbritsev kromatiini kontekst (Knott et al., 2012, Lööke et al., 2013). Peale selle, on leitud, et ARSid, mille ACS järjestuse läheduses on vähemalt kaks Fkh transkriptsioonifaktorite seondumiskohta, mis on üksteisest ~60-120 bp kaugusel, on valdavalt varajase aktivatsiooniajaga (Lööke et al., 2013).

Forkhead transkriptsioonifaktorite mõju replikatsiooni alguspunktide ajastusele on küll kinnitatud, kuid nende toimemehhanism ei ole veel täielikult teada. Arvatakse, et Fkh faktorite abiga tuuakse varajased *origin*'id rakutuumas kokku piirkondadesse, kus esineb kontsentreeritud koguses Cdc45 ja teisi replikatsioonifaktoreid. Nii tekivad replikatsioonivabrikud ning kõik sinna koondunud *origin*'id aktiveeritakse S-faasi alguses (Knott et al., 2012).

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Varasemates uurimustes on leitud, et pagaripärmis on mitmeid DNA replikatsiooni alguspunkte, mille ajastus ei sõltu nende asukohast genoomis. Antud positsioonist sõltumate *origin*'ide järjestused sisaldavad vähemalt kahte Forkhead transkriptsioonifaktorite seondumiskohta ning Fkh1 sidumine mõjutab nende aktivatsiooniaega. Arvatakse, et Fkh1 seondumine *origin*'idega sõltub Fkh1/2 konsensusjärjestuste paiknemisest ACSi suhtes, kusjuures oluline võib olla ka seondumiskohtade omavaheline kaugus (Knott et al., 2012; Lõoke et al., 2013).

Selle töö eesmärk oli leida:

- 1) kas Forkhead1 seondumine *origin*'idega sõltub ACS järjestusest
- 2) kas ACSi lähedal asuva kahe Fkh1/2 konsensusjärjestuse omavaheline kaugus mõjutab Forkhead1 seondumist replikatsiooni alguspunktidega
- 3) kas Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavaheline kaugus mõjutab replikatsiooni alguspunktide ajastust

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud söötmed

*S. cerevisiae*' tüvesid kasvatati YPD (ingl *yeast extract, peptone, dextrose*) tardsöötmele [agar 20 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), pärmiekstrakt 10 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), mükoloogiline peptoon 20 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), glükoos 20 g/l (*Medipharma*)] ja YPD vedelsöötmele [pärmiekstrakt 10 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), mükoloogiline peptoon 20 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), glükoos 20 g/l (*Medipharma*)].

Transformatsiooniks kasvatati AKY773 tüve (Lisa 1) ette –URA tardsöötmele [agar 20 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), glükoos 20 g/l (*Medipharma*), YNB (ingl, *yeast nitrogen base*) 6,7 g/l

(*Applichem*), aminohapped ja nukleotiidid – adeniin 40 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, leutsiin 80 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml (*Serva*)]

*URA3* selektsioonimarkeri vahetumist eeldatavalt rakkudesse transformeeritavate fragmentide vastu kontrolliti 5-FOA-d (5-fluoro-orootape, ingl *5-Fluoroortic acid*) sisaldaval selektiivsöötmeal [5-FOA 1 mg/ml (*Toronto Research Chemicals Inc.*), YNB 6,7 g/l (*Applichem*), agar 20 g/l (*LAB M<sup>TM</sup>*), glükoos 20g/l (*Medipharma*), lämmastikalused ja aminohapped – adeniin 20 µg/ml, uratsiil 100 µg/ml, lüsiin 80 µg/ml, leutsiin, 80 µg/ml, histidiin 40 µg/ml, trüptofaan 40 µg/ml (*Serva*)]

### 2.2.2 Kasutatud pärmitüved

Kõik töös kasutatud pärmitüved on *Saccharomyces cerevisiae* W303 taustaga. Tüvede genotüübid on toodud välja töö lisamaterjalis (Lisa 1). Kromatiini immuunsadestamise katsete jaoks on oluline, et kõikides tüvedes sisaldab Forkhead1 C-terminaalses otsas kolmekordset 3F12 epitoomärgist. Rakkude G1-faasi arresti indutseerimiseks  $\alpha$ -faktoriga, on tähtis, et *BAR1* (ingl *Barrier to the alpha factor response*) geen on tüvedest deleteeritud (*Bar1* lagundab  $\alpha$ -faktorit). Kasutatud tüvede genotüübid erinevad oluliselt vaid selle poolest, milline ARS305 või ARS607 variant on kloneeritud nende *VPS13* (ingl *Vacuolar protein sorting 13*) lookusesse (*wild-type* või erinevad mutandid). ARS305 puhul on muteeritud olulised ACSi nukleotiidid (ptk 2.3.1 Joonis 4). ARS607 puhul on liigutatud selles esinevate Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelist kaugust (ptk 2.3.2 Joonis7).

### 2.2.3 Tüvede valmistamine

*Saccharomyces cerevisiae* tüved AKY773, AKY775, AKY956 ja AKY992 on valmistatud kromatiini tööühma liikmete poolt. AKY901-AKY909, AKY791 ja AKY794 konstrueeriti pärmitüve AKY773 põhjal elektroporatsiooni abil (genotüübid - Lisa 1).

#### A. Transformeeritavate DNA fragmentide ettevalmistamine

Transformatsiooni läbiviimiseks oli esmalt vaja plasmide, mis sisaldaksid ARS607 või selle erinevaid mutante. Kasutati plasmidi pBluescript, kuhu oli kloneeritud 4 kb *VPS13* geeni

järjestusest (1 kb – 5 kb). *VPS13* 3 kb piirkonda oli erinevate plasmiidide puhul kloneeritud erinevad ARS607 variandid (ptk 2.3.2 Joonis 6, Joonis 7). Kõik plasmiidid olid konstrueeritud meie uurimisrühma laborandi Kersti Kristjuhani poolt.

Antud plasmiididelt amplifitseeriti VPS2,5k-3k\_F (5'-CGATCAGGCGAAAATAGCATT-3') ja VPS3-3,5k\_R (5'-CGCGGACACCAAGTTTGATAT-3') praimereid kasutades PCR meetodil transformatsiooniks sobilikud DNA lõigud. PCR viidi läbi 50 µl-s, reaktsioonisegu sisaldas 1 x Pfu puhvrit, 2,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 mM dNTP, 1,2 U Pfu DNA polümeraasi (*Thermo Scientific*), 10 ng plasmidi, 1 µM F ja R praimereid (*Metabion*), lõppmahuni deioniseeritud vett. PCR programm: algne denaturatsioon 95 °C 3 min; [denaturatsioon 95 °C 30 sek, praimerite seondumine 60 °C 30 sek, elongatsioon 72 °C 2,5 min] – 25 tsüklit; lõpp-ekstensioon 72 °C 7 min. Amplifitseeritud fragmendi olemasolu ja pikkust kontrolliti agaros-geelelektroforeesiga. Saadud PCRi produkt sadestati etanooliga ning lahustati 25 µl-s deioniseeritud vees.

#### *B. Transformeerimine elektroporatsiooni abil*

Amplifitseeritud PCRi fragmendid sisaldasid mõlemas otsas *VPS13*-ga homoloogset järjestust ning *VPS13* 3 kb juures erinevaid ARS607 järjestusi. Kui viia antud DNA fragmendid elektroporatsiooni abiga pagaripärmi rakkudesse, toimub eeldatavalt teatud sagedusega homoloogne rekombinatsioon loodusliku *VPS13* järjestuse (mis tüve AKY773 puhul sisaldab 3 kb juures *URA3* markergeeni) ja rakkudesse transformeeritud ARS järjestusi sisaldavate *VPS13* järjestuse vahel. Nii saadakse tüved, kus genoomses DNAs on *VPS13* järjestuse sees eelnevalt konstrueeritud erinevad ARS607 variandid. Elektroporatsioon viidi läbi järgnevalt.

AKY773 tüve kasvavati enne transformeerimist –URA tardsöötmele, et elimineerida rakud, mille *VPS13*-s asuv *URA3* on defektne. Elektroporatsiooniks kasvatati AKY773 tüve 25 ml-s YPD vedelsöötmes üleöö temperatuuril 30 °C kuni tiheduseni 1 x 10<sup>8</sup> rakku/ml. Rakukultuuri tihedust mõõdeti siin ja edaspidi rakuloenduriga [*Z<sup>TM</sup> COULTER COUNTER<sup>®</sup> Cell and Particle Counter (Beckman Coulter)*]. Rakud koguti tsentrifuugides 3 min 450 g juures, supernatant eemaldati. Rakud suspendeeriti 9 ml TE-s, lisati 1 ml 1 M liitiumatsetaati ning rakukultuuri kasvatati 45 min 30 °C loksutil, 100 rpm (*New Brunswick Scientific Excella<sup>TM</sup> E25*). Suspensiooni lisati 250 µl 1 M DTT-d (ditiotreitool) ning rakke kasvatati samadel tingimustel veel 15 min. Rakkudele lisati 40 ml deioniseeritud vett ning tsentrifuugiti 450 g juures 5 min. Järgmiseks pesti rakke kaks korda 50 ml jääkülma deioniseeritud veega. Alates sellest hetkest hoiti rakke jääl. Rakud suspendeeriti 1 ml jääkülmas 1 M sorbitoolis, viidi 1,5

ml reaktsioonituubi ning tsentrifuugiti 1 min 3300 g juures. Supernatant eemaldati ning viimast etappi korrati. Rakusademele lisati 50 µl 1 M sorbitooli. Saadi väga tihe rakususpensioon, mis jagati vastavalt transformeeritavate PCRi fragmentide arvule 40 µl kaupa uutesse reaktsioonitubidesse. Rakkudele lisati 15 µl puhastatud PCRi produkti ning saadud segu tõsteti 2 mm elektroporatsiooni küveti. Elektroporeerimine viidi läbi masinaga Gene Pulser Xcell (*Bio-Rad*), kasutati pagaripärmi elektroporeerimiseks eelseadistatud programmi. Pärast elektroporatsiooni hoiti rakke 20 min jääl, seejärel tõsteti need 1,5 ml reaktsioonituubi ning tsentrifuugiti 3300 g juures 1 min. Supernatant eemaldati, rakud suspendeeriti 100 µl deioniseeritud vees ning külvati YPD tardsöötmele. Järgmisel päeval tembeldati rakud ümber 5-FOA-d sisaldavale selektiivtassile, mis on Ura3 sünteesivatele rakkudele letaalne. Kolme päeva pärast külvati teatud hulk kolooniaid YPD tardsöötmele. Rakkudest eraldati DNA (protokoll Lööke et al., 2011) ning kolooniate *VPS13* geeni 3 kb ümbrust amplifitseeriti PCRiga, kasutades praimereid VPS3k\_alt\_F (5'-ACGGATCC TAACGCTCCAGA-3') ja VPS3k\_dist\_R (5'-CTAAATACCGAATCCCTGGAAAA-3') (*Metabion*). Valiti välja kolooniad, mille puhul PCRi fragmendi pikkus vastas sisestatud ARSi pikkusele. Kõikide konstrueeritud tüvede *VPS13* 3 kb ümbrus sekveneeriti.

#### 2.2.4 Kromatiini immuunsadestamine (ChIP)

##### A. Rakulüsaatide tegemine

Pärmitüvesid kasvatati üleöö 25 ml-s YPD vedelsöötmes 30 °C juures loksutil kuni tiheduseni  $\sim 6 \times 10^6$  rakku/ml. G1-faasi arresti indutseerimiseks lisati söötmesse paardumisferomoon  $\alpha$ -faktor (lõppkontsentratsiooniga 100 nM) ning rakke kasvatati samadel tingimustel veel 3 tundi. Rakkude arrestumist kontrolliti läbivoolutsütomeetriga (ptk 2.2.6), proovid võeti enne ja pärast  $\alpha$ -faktori lisamist söötmesse. Rakud fikseeriti formaldehüüdiga (*Applichem*) (lõppkontsentratsiooniga 1%) ning hoiti 15 min toatemperatuuril, aeg-ajalt segades. Seejärel lisati rakkudele glütsiin (*Applichem*) (lõppkonts. 200 mM), segati ning hoiti veel 5 min toatemperatuuril. Rakukultuuri tsentrifuugiti 3 min 450 g juures, sööde eemaldati ning rakke pesti kaks korda 10 ml 1% PBSiga (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM), rakke koguti igas etapis 3 min 450 g juures tsentrifuugides. Rakud suspendeeriti 1 ml-s FA-lüüsipuhvris (koostis Lisa 2) ning viidi 1,5 ml reaktsioonituubi. Suspensiooni tsentrifuugiti kuni 16100 g saavutamiseni. Sööde eemaldati ning vajadusel säilitati rakke

-80 °C juures kuni katse jätkumiseni. Rakud suspendeeriti 500 µl-s FA-lüüsipuhvris ning reaktsioonituubi lisati ~200 µl 0,5 mm läbimõõduga klaaskuule (*BioSpec Products Inc.*). Rakke lõhuti klaaskuulidega 15 min 4 °C juures, kasutades väristamiseks masinat Disruptor Genie™ (*Scientific Industries*). Rakulüsaadi kättesaamiseks tehti reaktsioonituubi põhja nõelaga auk ning asetati see uue 2 ml reaktsioonituubi sisse. Tsentrifugiti 1 min 2300 g juures. Saadud lüsaadile lisati 1 ml FA-lüüsipuhvrit ning kogu lüsaat viidi 15 ml reaktsioonituubi. Lüsaati sonikeeriti 15 ml tuubis 8 min poole minutiliste intervallide kaupa [30 s sonikeerimist, 1 min pausi, ~4 °C juures, *high* režiim, *Bioruptor®* (*Diagenode*)]. Rakulüsaat viidi 1,5 ml reaktsioonituubi ning tsentrifuugiti 5 min 16100 g juures (temperatuuril 4 °C). Supernatant viidi uude reaktsioonituubi ning tsentrifuugiti samadel tingimustel 15 min. Saadud kogu rakkude ekstrakti (WCE, ingl *whole cell extract*) kasutati järgnevalt kromatiini immuunsadestamise katsetes.

### B. Immuunsadestamine

Kõikide töös kasutatud tüvede Forkhead1 valgu C-terminuses on kolmekordne 5E11(3F12) märgis, mille tunneb ära 5E11 antikeha. Immuunsadestamisel kasutati kommersiaalselt 5E11 antikeha (*Icosagen*). Reaktsioonis kasutati 300 µl WCEd ning 0,5 µg antikeha. Proove inkubeeriti üleöö 4 °C juures aeglaselt keerutades. Järgmisel päeval tsentrifuugiti reaktsioonituube 15 min 16100 g juures. Supernatant kanti uude reaktsioonituubi. Samal ajal pesti proteiin-A kerakesi [*Protein A Sepharose™ Fast Flow* (*Ge Healthcare*)] 500 µl FA-BSA lahusega [FA-lüüsipuhver + BSA (ingl *bovine serum albumine*) (1 mg/ml)]. Pestud proteiin-A kerakestele lisati 50 µl FA-BSAd ühe ChIP reaktsiooni kohta ning inkubeeriti 15 min 4 °C juures. Eelnevalt tsentrifuugitud ChIP proovidele lisati 45 µl proteiin-A kerakeste ja FA-BSA segu. Proove inkubeeriti 1,5 h 4 °C juures aeglaselt keerutades. Reaktsioonituube tsentrifuugiti 1 min 2300 g juures ning supernatant eemaldati. Proteiin-A kerakesi pesti järjestikku 1 ml FA-lüüsipuhvri, FA500, LiCl ning TES pesulahustega, lahuste koostised on kirjas töö lisamaterjalis (Lisa 2). Iga lahusega inkubeeriti proove 5 min 4 °C juures aeglaselt keerutades, pesude vahel tsentrifuugiti reaktsioonituube 1 min 2300 g juures. Proteiin-A kerakestele lisati 100 µl elueerimispuhvrit (Lisa 2), proove loksutati 10 min toatemperatuuril. Proove tsentrifuugiti 1 min 2300 g juures, supernatant koguti uude reaktsioonituubi. Elueerimise etappi korrati ning kokku saadi 200 µl elueeritud proovimaterjali. Sellele lisati 200 µl deioniseeritud vett ja 20 µg Proteinaas-K'd (*Thermo Scientific*). Proove inkubeeriti üleöö 65 °C juures.



### C. Fenool-kloroform töötlus

DNA eraldati fenool-kloroform töötlusega. Proovidele lisati proovimaterjaliga võrdne hulk (400 µl) fenool-kloroformi (1:1) (*Applichem; Sigma-Aldrich*), segati 1 min vortexil ning tsentrifuugiti 4,5 min 16100 g juures. Vesifaas eraldati ning sellele lisati proovimaterjaliga võrdne hulk (400 µl) kloroformi, segati 0,5 min vortexil ning tsentrifuugiti 4,5 min 16100 g juures. Vesifaas eraldati ning sellele lisati DNA sadestamiseks 1/10 proovi mahust (40 µl) 3M naatriumatsetaati, 20 µg glükokeeni ja 3 x proovi mahus (1,2 ml) 96% etanooli. Proove hoiti -80 °C juures minimaalselt 20 min, tsentrifuugiti 15 min 16100 g juures temperatuuril 4 °C. DNAd pesti 1 ml 70% etanooliga ning tsentrifuugiti 5 min samadel tingimustel. DNA lahustati 200 µl-s deioniseeritud vees.

Kõikide tüvedega viidi kromatiini immuunsadestamise katsed läbi kolm korda.

#### 2.2.5 Kvantitatiivne PCR (qPCR)

Kromatiini immuunsadestamisel eraldatud DNAd analüüsiti kasutades qPCR meetodit (masin *LightCycler® 480 Real-Time PCR System, Roche*) Reaktsioonid viidi läbi mahus 10 µl. Kasutati 5 µl DNAd ning 5 µl qPCR reagentide segu [*Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2x (Thermo Scientific)*], kuhu oli lisatud *forward* ja *reverse* praimerid [1 µM, lõppkontsentratsioon qPCR reaktsioonis 0,5 µM, (*Metabion*)]. Töös kasutatud qPCR praimerid on välja toodud töö lisamaterjalis (Lisa 3). AKY901-909, AKY791 ja AKY794 ChIP katsetes kasutati primereid ARS501\_F/R, ARS607up\_F/R, ARS737\_F/R, VPS3k\_dist\_F/R. AKY956, AKY992 ja AKY775 ChIP katsetes kasutati primereid ARS305\_F/R, ARS501\_F/R, ARS605\_F/R, PAU1\_F/R, VPS3k\_dist\_F/R. qPCR programm: algne denaturatsioon 95 °C 15 min - 1 tsükel, [denaturatsioon 95 °C 15 s, praimerite seondumine 58 °C 20 s, elongatsioon 72 °C 20 s] – 40 tsükli, sulamistemperatuuri analüüs [95 °C 15 s, 60 °C 1 s, 0,1 °C kaupa kuni 95 °C]

Ühel qPCRi plaadil analüüsiti iga DNAd iga praimeripaariga kolmes korduses ning arvesse võeti kolme replikaadi keskmine tulemus. Reaktsioonide lävitsükliid ehk Cp-d (ingl *crossing point*) arvutati *Lightcycler® 480* tarkvara kasutades (meetod *Abs quant/2nd derivative max, efficiency=2*). Tulemuste analüüsimiseks kasutati relatiivset kvantifitseerimise meetodit ning ChIP katsete puhul normaliseeriti andmed a) ARS607 mutantide puhul genoomse ARS607

järjestuse tulemustega b) ARS305 mutantide puhul genoomse PAU1 järjestuse tulemustega. Tulemusi analüüsi arvutiprogrammiga Microsoft Excel, p-väärtused leiti t-testi kasutades.

DNA kahekordistumise katsete puhul viidi qPCR läbi sama protokoll järgi. Kasutati primereid ARS501\_F/R, ARS305\_F/R, ARS607kj\_F/R, VPS3k\_dist\_F/R (Lisa 3). Tulemused normaliseeriti hilise *origin*'i, ARS501, tulemustega ning iga ARSi puhul eraldi vastava 0-ajapunkti tulemusega.

## 2.2.6 Rakutsükli analüüsimine läbivoolutsütomeetriga

Rakutsükli analüüsi jaoks koguti  $\sim 10^6$  rakku ning need fikseeriti 10 ml-s 70% etanoolis. Proove hoiti kuni analüüsimiseni 4 °C juures (minimaalselt 40 min). Proove tsentrifuugiti 3 min 1500 g juures, etanool eemaldati ning rakke pesti kaks korda 50 mM naatriumtsitraadiga. Pärast teist pesu lisati rakkudele 1 ml 50 mM naatriumtsitraati, mis sisaldas 10 µg RNaseA-d (*Sigma*) ning proove sonikeeriti 3 x 30 sek [30 sek sonikeerimist, 1 min pausi, *Bioruptor*®, (*Diagenode*)]. Proove inkubeeriti üleöö 37 °C juures. Reaktsioonituube tsentrifuugiti 5 min 16100 g juures, voolutsütomeetria analüüsiks viidi proovi maht 100 µl-ni. Reaktsiooni lisati 1 x koguses SYBR® Green I värv (*Applichem*), proove segati vortexil ning hoiti 30 min toatemperatuuril pimedas. Voolutsütomeetria analüüsid viis läbi Dmitri Lubenets, kasutades masinat BD FACSAria™ (*BD Biosciences*). Rakutsükli analüüsimine viidi läbi arvutiprogrammiga Cyflogic.

## 2.2.7 DNA replitseerumise määramine

DNA replitseerumise katsed viidi läbi AKY901-909, AKY791 ja AKY794 tüvedega, mis sisaldavad *VPS13* lookuses erinevaid ARS607 Fkh konsensusjärjestuste mutante. Pärimüvesid kasvatati 25 ml YPD vedelsöötmes 30 °C juures kuni tiheduseni  $6 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ . G1-faasi arresti indutseerimiseks lisati söötmesse  $\alpha$ -faktor (100 nM) ning rakke kasvatati edasi 3 h 24 °C juures loksutil. G1-arrestist vabastamiseks pesti rakke kaks korda autoklaavitud deioniseeritud veega, tsentrifuugides rakke pesude vahel 800 g juures 2 min. Rakud suspendeeriti üles söötmes, mis sisaldas pronaasi (50 µg/ml, *Applichem*) ning

hüdrosüüreat (HU) (200 mM, *Carbosynth*). Kohe pärast uue söötme lisamist võeti 0-ajapunkt. Ajapunkti võtmine: DNA kahekordistumise määramiseks võeti rakususpensioonist 1 ml proovimaterjali (1,5 ml reaktsioonituubi), rakud tsentrifuugiti põhja (16100 g saavutamiseni) ning pesti üks kord 1 x PBSiga. Rakud külmutati kiiresti vedelat lämmastikku kasutades. Rakke hoiti kuni katse jätkumiseni -80° C juures. Paralleelselt võeti rakutsükli kontrollimiseks voolutsütomeetria proov (ptk 2.2.6). Ajapunktid võeti 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min ja 75 min pärast uue söötme lisamist.

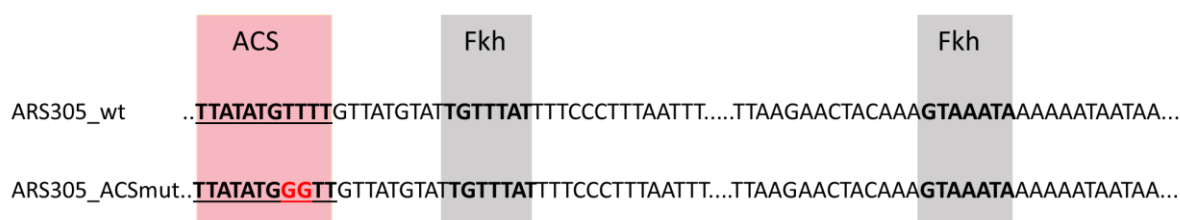
Rakkudele lisati 300 µl lüüsipuhvrit [10 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton X-100 (*Appllichem*)] ning ~100 µl 0,5 mm läbimõõduga klaaskuule (*BioSpec Products Inc.*). Rakke lõhuti 10 min 4 °C juures väristajal [*Disruptor Genie<sup>TM</sup>* (*Scientific Industries*)]. Rakulüsaadi kättesaamiseks tehti reaktsioonituubi sisse nõelaga auk, see asetati uue 2 ml reaktsioonituubi sisse ning tsentrifuugiti 1,5 min 2300 g juures. DNA eraldamiseks kasutati fenool-kloroform meetodit (ptk 2.2.4 C, proovi maht 300 µl), DNA lahustati 200 µl-s deioniseeritud vees. DNA lahjendati qPCRi jaoks sobivaks (~20 ng/µl). Erinevate *origin*'ide DNA kahekordistumist kontrolliti qPCRi meetodiga (ptk 2.2.5). Kõikide tüvedega tehti kolm korduskatset.

## 2.3 Tulemused

Forkhead1 transkriptsioonifaktorit peetakse üheks oluliseks replikatsiooni alguspunktide varajase ajastuse määrajaks (Knott et al., 2012). Selles töös uuriti ARS305 ja ARS607 näitel Fkh1 valgu seondumise sõltuvust *origin*'ide nukleotiidsest järjestusest. Nii ARS305 kui ka ARS607 on efektiivsed ja varajased replikatsiooni alguspunktid ning nende aktiveerumise aeg ei muutu, kui need paigutada hiliselt replitseeruvasse genoomi piirkonda. ARS305 ja ARS607 varajane ajastus sõltub aga Fkh1 seondumisest ACSi lähedusse (Lööke et al., 2013). Fkh1 seondumist antud *origin*'idega võimaldavad kaks Fkh1/2 seondumiskohta, mis asuvad teineteisest 72 bp kaugusel (Siow et al., 2012). Käesolevas töös leiti, et Fkh1 valgu seondumist varajaste *origin*'idega mõjutab Fkh1/2 konsensusjärjestuste läheduses asuv funktsionaalne ACS element. Lisaks kinnitati, et kahe Fkh1/2 konsensusjärjestuse omavaheline kaugus on Forkhead1 valgu sidumises ja *origin*'ide ajastuse määramises oluline.

### 2.3.1 Fkh1 sidumise sõltuvus ACS järjestusest

ACS on pagaripärmi replikatsiooni alguspunkte defineeriv järjestus. ACS järjestusele seondub kuuesubühikuline ORC ning see on eelduseks kogu järgneva replikatsioonikompleksi moodustumiseks (ptk 1.2;1.3). Replikatsiooni alguspunktid, mille ACSi läheduses on Fkh1/2 konsensusjärjestused ning mis seovad G1-faasis Forkhead1, on enamasti varajased. Fkh konsensusjärjestuste esinemine ei ole aga Forkhead1 sidumiseks ainuke eeldus, rolli mängivad ka teised, seni teadmata tegurid (Lõoke et al., 2013; Ostrow et al., 2014). Töös uuriti *origin*'ide Fkh1 sidumise sõltuvust funktsionaalsest ACS järjestusest. Selleks viidi läbi kromatiini immuunsadestamise katsed pagaripärmi tüvedega, mis sisaldavad *VPS13* lookuses kas ARS305 *wild-type* järjestust või ARS305 järjestust, mille ACSis on funktsionaalselt olulised nukleotiidid muteeritud (Joonis 4) (Huang & Kowalski, 1993). Kontrolltüve *VPS13* lookuses ARS järjestus puudub.

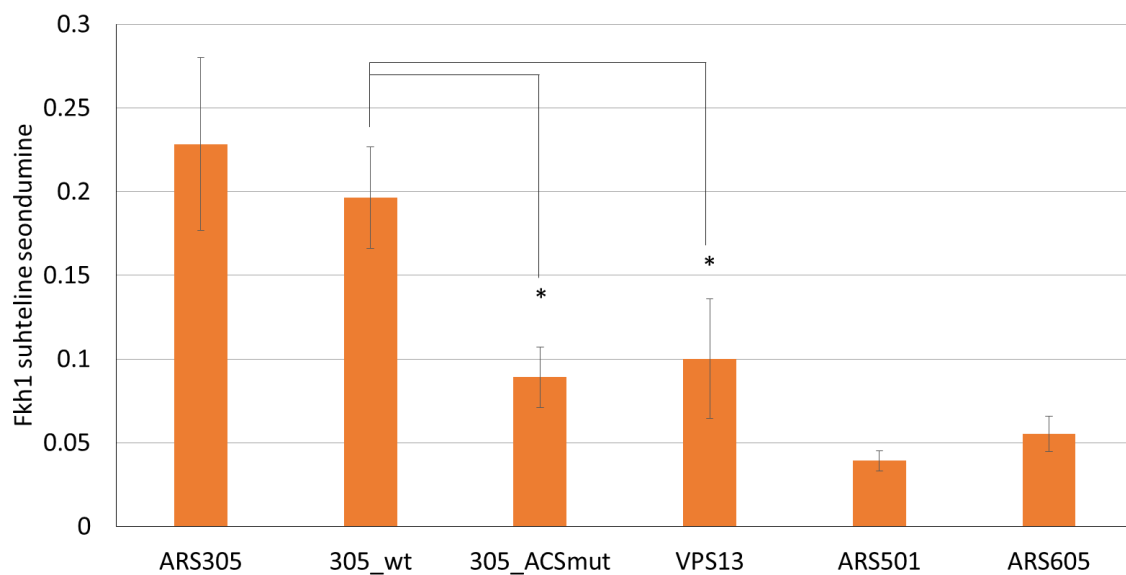


**Joonis 4. ARS305 variandid ARS305\_wt ja ARS305\_ACSmut.** *Origin*'ide ACS järjestused on alla joonitud ning paksus kirjas. Fkh konsensusjärjestused on paksus kirjas ning ümbritsetud halli kastiga. Esimeses reas on näidatud ARS305 *wild-type* järjestus. Teises reas näidatud ARS305\_ACSmut puhul on selle ACS järjestuses muteeritud kaks T nukleotiidi G nukleotiideks (tähistatud punase kirjaga) (andmed Siow et al., 2012).

Forkhead1 suhtelist seondumist G1-faasis mõõdeti kasutatud pärmitüvede looduslike replikatsiooni alguspunktide, ARS305, ARS501 ja ARS605, ning *VPS13* lookuses asuvate ARS305\_wt ja ARS305\_ACSmut piirkonnas (kontrolliks *VPS13*, mis ei sisalda ARS järjestust).

ARS501 ja ARS605 ei sisalda Fkh1/2 konsensusjärjestusi ning Forkhead1 seondumine nendega on seetõttu nõrgim (Joonis 5). Seejuures on ARS501 hiline replikatsiooni alguspunkt, ARS605 aga varajane, kuid Fkh-sõltumatu (Lõoke et al., 2013). Võrreldes looduslikus lookuses asuva ARS305 ja *VPS13* lookusesse kloneeritud ARS305\_wt Fkh1

suhtelist sidumist, näeme, et *VPS13* lookusesse tõstmine ei mõjuta oluliselt ARS305 Fkh1 sidumise määra (Joonis 5). *VPS13*, kuhu ei ole sisestatud replikatsiooni alguspunkti, on looduslikult hiliselt replitseeruv piirkond (Lõoke et al., 2013). Looduslik *VPS13* lookus seob Forkhead1 transkriptsioonifaktorit oluliselt vähem kui *VPS13* mis sisaldab ARS305\_wt *origin*'i ( $p < 0,05$ ) (Joonis 5). ARS305\_ACSmut seob Fkh1 transkriptsioonifaktorit sama nõrgalt kui ilma ARS järjestuseta *VPS13* (Joonis 5). Oluline on märkida, et mõlema ARS305 variandi (wt ja ACSmut) puhul on Fkh1/2 seondumiskohad muteerimata ja paiknevad mõlemas ARSis ühtmoodi. See tähendab, et konsensusele vastav ACS järjestus on *origin*'ide piirkonnas Forkhead1 sidumiseks oluline.

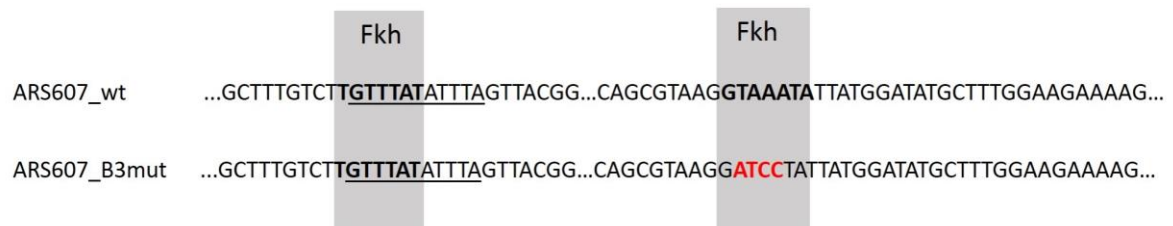


**Joonis 5. Fkh1 valgu suhteline seondumine erinevatele ARS305 variantidele.** Kromatiini immuunsadestamise katsete tulemused, y-teljel on näidatud on Fkh1 valgu suhteline seondumine. Andmed on normaliseeritud genoomse PAU1 järjestuse tulemusega. ARS305, ARS501 ja ARS605 on replikatsiooni alguspunktid oma looduslikes lookustes. ARS305\_wt on *VPS13* lookusesse kloneeritud ARS305. ARS305\_ACSmut on *VPS13* lookusesse kloneeritud ARS305, mille ACS järjestus on muteeritud. Veapiiridena on välja toodud kolme katse standardhälve. \* $p < 0,05$ , võrreldud *VPS13* lookuses paiknevaid järjestusi (305\_wt suhtes)

### 2.3.2 Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelise kauguse mõju Fkh1 seondumisele

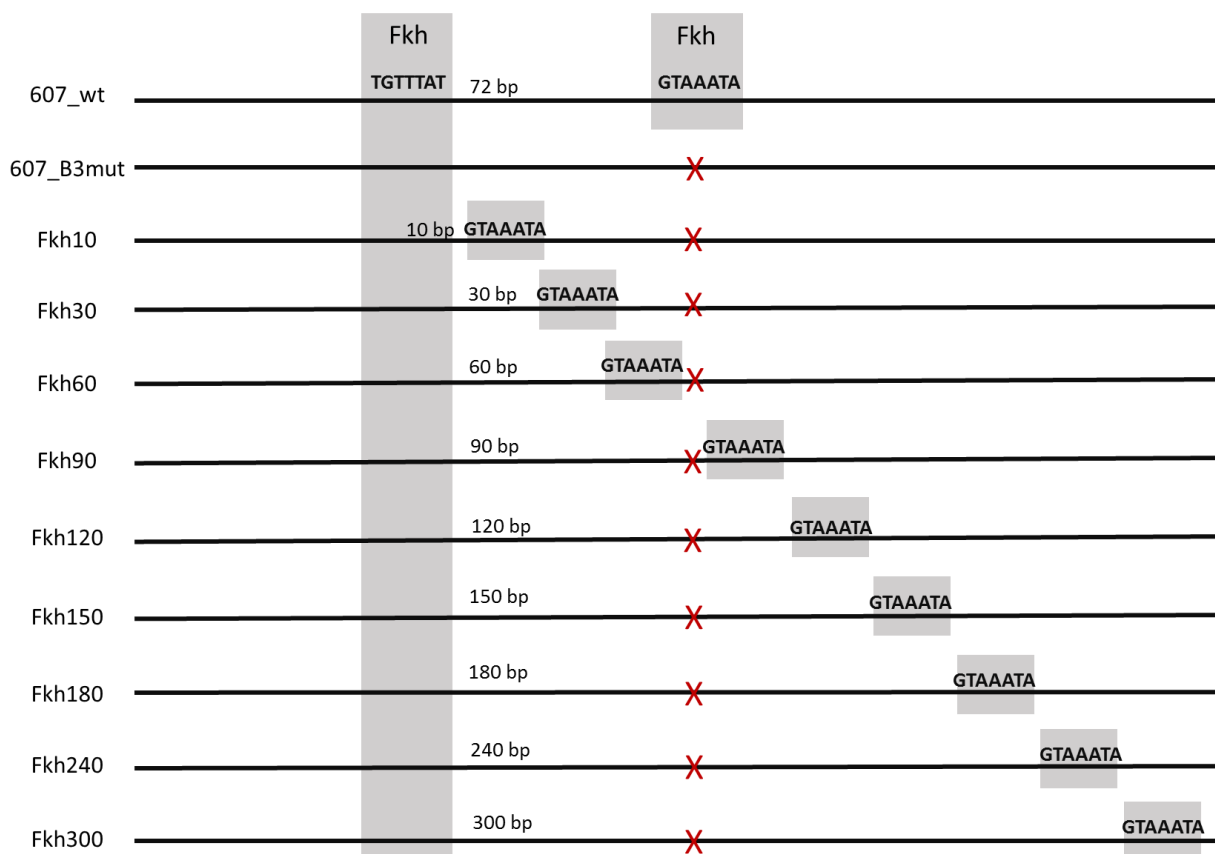
Järgmiseks töö eesmärgiks oli leida, kas Fkh1 seondumine *origin*'i DNAGA sõltub Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelisest kaugusest. Selleks kasutasime pärmistüvesid, mille *VPS13*

lookusesse kloneeriti ARS607 või selle erinevad Fkh-mutandid (Joonis 6, Joonis 7). Esiteks konstrueeriti ARS607\_B3mut järjestus, mille üks Fkh1/2 seondumiskoht on muteeritud (Joonis 6). Muteeritud seondumiskoht asub ACSis asuvast Fkh1/2 järjestusest 72 bp kaugusel ning see on osa ARS607 B3 domeenist (Chang et al., 2011).



**Joonis 6. ARS607 variandid ARS607\_wt ja ARS607\_B3mut.** *Origin*'ide ACS järjestus on alla joonitud. Fkh1/2 konsensusjärjestused on märgitud paksu kirjaga. Esimeses reas on näidatud ARS607\_wt järjestus. Teises reas näidatud ARS607\_B3 mut puhul on üks Fkh konsensusjärjestus muteeritud, muteeritud nukleotiidid on tähistatud paksu punase kirjaga (andmed Siow et al., 2012).

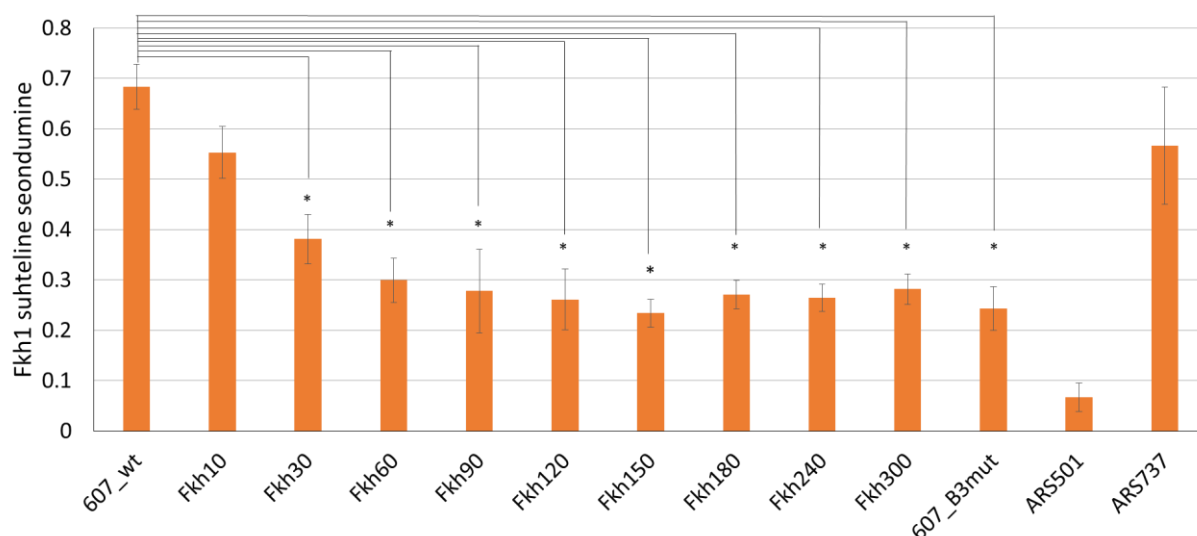
ARS607\_B3mut *origin*'i alusel konstrueeriti järgnevad üheksa ARS607 mutanti: kõikide uute ARS607 variantide B3 domeenis asuv Fkh1/2 konsensusjärjestus on muteeritud, erinevate konstruktide puhul on ACSis asuvast Fkh-saidist vastavalt 10 bp, 30 bp, 60 bp, 90 bp, 120 bp, 150 bp, 180 bp, 240 bp ja 300 bp kaugusele sisestatud uus Fkh konsensusjärjestus (Joonis 7). Kõik ARS607 variandid kloneeriti pagaripärmi *VPS13* lookusesse ning saadud tüvesid kasutades uuriti kromatiini immuunsadestamise abil Fkh1 seondumist erinevate mutantsete *origin*'idega.



**Joonis 7. ARS607 põhjal konstrueeritud ARS607 Fkh-mutandid.** Skemaatiliselt on kujutatud töös kasutatud ARS607 variantide Fkh1/2 konsensusjärjestuste paiknemine. Esimesel real on ARS607\_wt järjestuse skeem, teisel real 607\_B3mut, mille B3-domeenis asuv Fkh-konsensus on muteeritud (tähistatud punase ristiga). Samuti on muteeritud kõigi ülejäänud Fkh-mutantide B3-domeen. Kõik ARS607 variandid jagavad ühte Fkh seondumiskohta, mis asub *origin*'i ACS järjestuses (joonisel vasakpoolne). B3-elementis muteeritud Fkh konsensusjärjestuse asemele on erinevate *origin*'ide puhul ACSis asuvast Fkh-konsensusest vastavalt 10 (Fkh10), 30 (Fkh30), 60 (Fkh60), 90 (Fkh90), 120 (Fkh120), 150 (Fkh150), 180 (Fkh180), 240 (Fkh240) ja 300 (Fkh300) aluspaari kaugusele sisestatud uus Fkh konsensusjärjestus.

Kromatiini immuunsadestamise katsetest selgus, et rakutsükli G1-faasis seob *VPS13* lookusesse sisestatud kahe Fkh1/2 konsensusjärjestusega ARS607\_wt *origin* Fkh1 valku pea kolm korda tugevamalt, kui ARS607\_B3mut, milles on vaid üks Fkh-sait. Katsetes kasutati positiivse kontrollina ARS737, mis sisaldab ACSi läheduses kahte Fkh konsensusjärjestust ning seob Fkh1 valku ARS607\_wt-ga sarnasel tasemel (Joonis 8). Ka varasemalt on näidatud, et Fkh1 seondumiseks on *origin*'ide piirkonnas vaja mitut Fkh1/2 seondumiskohta (Lööke et al., 2013). Kõik ülejäänud töös konstrueeritud ARS607 mutandid sisaldavad samuti kahte Fkh1/2 konsensusjärjestust, erineb ainult nende kahe järjestuse omavaheline kaugus. ChIP katsete tulemustest näeme, et ARS607 mutantne *origin*, milles kahe Fkh1/2

konsensusjärjestuse vahemaa on 10 aluspaari (Fkh10), seob Forkhead1 sarnase tugevusega kui ARS607\_wt ( $p>0,05$ ). Ülejäänud kaheksa ARS607 Fkh-mutandi puhul jääb Fkh1 suhteline seondumine 607\_B3mut *origin*'iga sarnasele tasemele, langedes võrreldes ARS607\_wt-ga kaks kuni kolm korda (Joonis 8). Seega, kõik ARS607 mutandid, mille järjestuses on kahe Fkh-saidi vahe suurem kui 10 bp, seovad Fkh1 valku oluliselt nõrgemalt kui ARS607\_wt ( $p<0,05$ ) (Joonis 8). See kinnitab, et ainuüksi konsensusjärjestuste olemasolust Fkh1 sidumiseks ei piisa ning seondumiskohtade omavaheline kaugus on Forkhead1 valgu sidumiseks oluline.



**Joonis 8. Fkh1 valgu suhteline seondumine erinevatele ARS607 variantidele.** Kromatiini immuunsadestamise katsete tulemused, y-teljel on näidatud on Fkh1 valgu suhteline seondumine. Andmed on normaliseeritud genoomse ARS607 järjestuse tulemustega. ARS501 ja ARS737 on replikatsiooni alguspunktid oma looduslikes lookustes. Veapiiridena on välja toodud kolme katse standardhälve. \* $p<0,05$ , võrreldud *VPS13* lookuses paiknevaid *origin*'e (607\_wt suhtes).

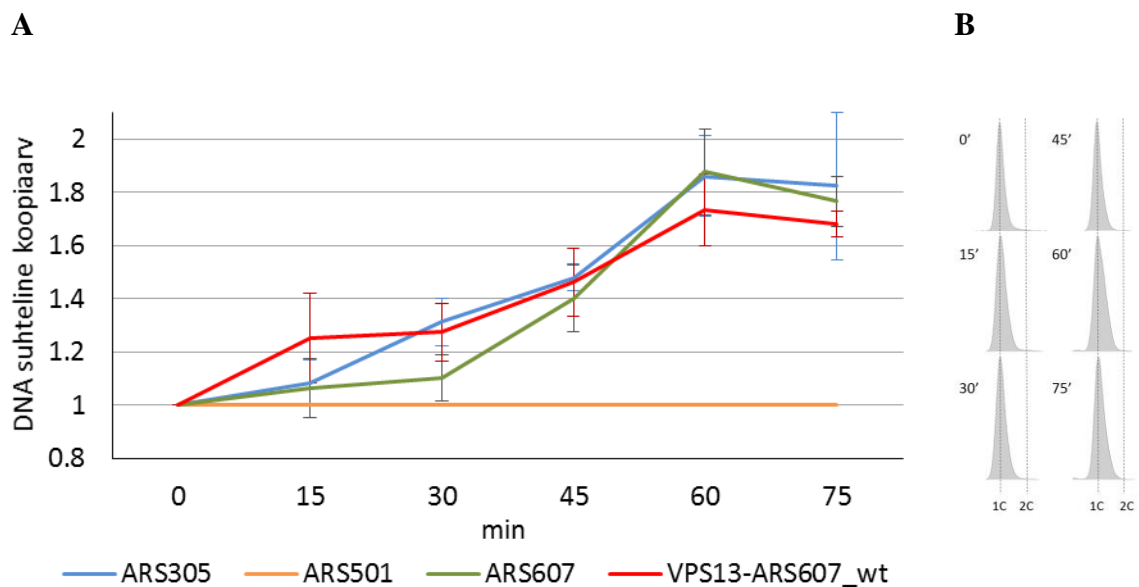
### 2.3.3 Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelise kauguse mõju *origin*'ide ajastusele

Järgmiseks tahtsime välja selgitada, kas Fkh1 seondumiskohtade omavaheline kaugus mõjutab lisaks Fkh1 seondumisele ka *origin*'ide ajastust. Selleks kasutasime *VPS13* lookuses ARS607 või ARS607 Fkh-mutante (Joonis 7) sisaldavaid pärimüvesid. Katsetes leiti qPCRi abiga erinevate replikatsiooni alguspunktide suhteline koopiaarv varajases S-faasis.  $\alpha$ -faktoriga G1-faasi viidud rakkude arrestist vabastamisel lisati söötmesse hüdroksüurea (HU).



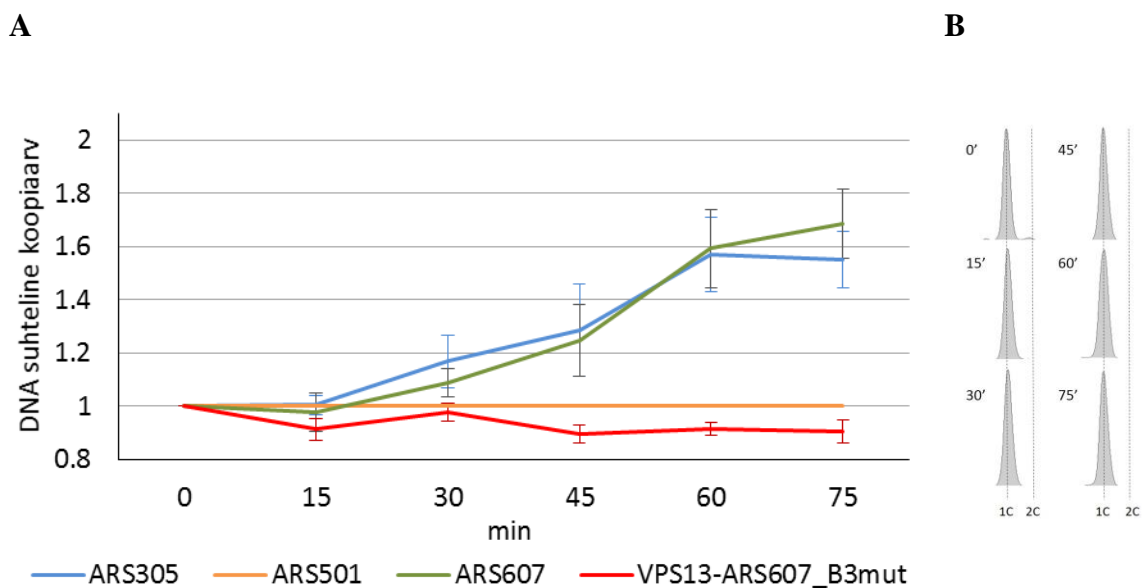
HU inhibeerib ensüümi ribonukleotiidi reduktaas ning selle tulemusena tekib rakkudes DNA replikatsiooniks vajalike nukleotiidide puudus ning rakutsükkel aeglustub niivõrd, et 75 minuti jooksul pärast G1-faasist vabastamist jäävad rakud S-faasi algusesse (Alvino et al., 2007). Seega on katsetingimustes HU juuresolekul varajastelt replikatsiooni alguspunktidelt võimalik replikatsiooni alustada, kuid hilistelt mitte. See kajastub nende DNA järjestuste suhtelises hulgas, varieerudes 1 ja 2 vahel.

Joonisel 9A on kujutatud *VPS13* lookuses *ARS607\_wt origin*'i sisaldava pärimitüve *ARS305*, *ARS607* ja *VPS13-ARS607\_wt* koopiaarvu muutus ajas (pärast G1-arrestist vabastamist). Tulemused on arvatatud *ARS501* suhtes, sest see on hiline replikatsiooni alguspunkt ning sellelt ei alustata HU juuresolekul replitseerumist. Joonistel 9B ja 10B on välja toodud tüvede rakutsükli analüüs igas katse ajapunktis. See näitab, et rakukultuurid on katse alguses G1-faasi sünkroniseeritud (0 min). Ka hilisemates ajapunktides on rakutsükli pilt analoogne, kuna HU arresti korral jäävad rakud 75 min jooksul S-faasi algusesse ning DNA hulga muutus ei ole voolutsütomeetriga tuvastatav.



**Joonis 9. DNA replitseerumine HU-arrestitud AKY791 tüve rakkudes. (A)** Erinevate replikatsiooni alguspunktide koopiaarvu muutus ajas, *ARS501* koopiaarvu suhtes, pärast G1-arrestist lahtilaskmist. **(B)** Voolutsütomeetria analüüsi tulemused 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min ja 75 min pärast rakkude G1-arrestist vabastamist ning HU arresti indutseerimist.

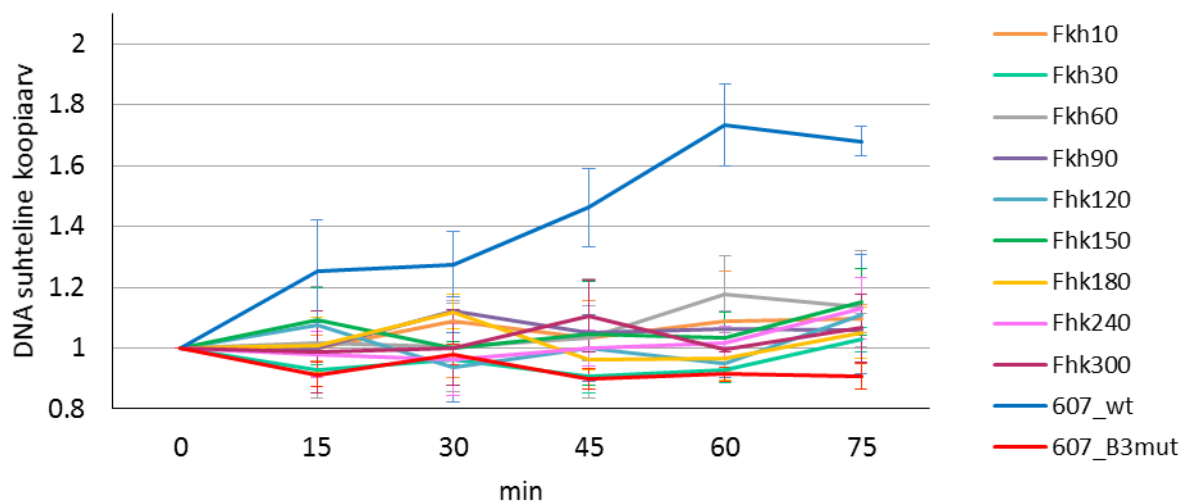
Jooniselt 9A on näha, et looduslikus lookuses asuvate ARS305 ja ARS607 DNA kahekordistub hiljemalt 60 minuti jooksul pärast rakkude G1-arrestist vabastamist. Sarnaselt replitseerub ka *VPS13* lookuses asuv ARS607\_wt *origin*. Joonisel 10 on kujutatud katsetulemusi pärmitüvega, mis sisaldab *VPS13* lookuses ARS607\_B3mut *origin*'i. Saadud tulemused kinnitavad, et HU arresti korral toimub ARS305 ja ARS607 replitseerumine. *VPS13* lookuses paiknev ARS607\_B3mut aga ei kahekordistu ning selle koopiaarv jääb ARS501-ga samale tasemele (Joonis 10A).



**Joonis 10. DNA replitseerumine HU-arrestitud AKY794 tüve rakkudes.** (A) Erinevate replikatsiooni alguspunktide koopiaarvu muutus ajas, ARS501 koopiaarvu suhtes, pärast G1-arrestist lahtilaskmist (B) Voolutsütomeetria analüüsi tulemused 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min ja 75 min pärast rakkude G1-arrestist vabastamist ning HU arresti indutseerimist.

Ülejäänud ARS607 Fkh-mutante sisaldavate tüvede (AKY901-AKY909) kõikide uuritud ARSide DNA replitseerumise graafikud on välja toodud töö lisamaterjalis (Lisa 4). Joonisel 11 on kokku koondatud kõikide tüvede *VPS13* lookuses asuvate erinevate ARS607 Fkh-mutantide replitseerumine võrreldes ARS501 *origin*'iga. Graafikult on selgelt näha, et ainult *VPS13* lookusesse sisestatud ARS607\_wt on võimeline HU arresti korral replitseeruma. See kinnitab väidet, et ARS607 püsib varajane ka siis, kui see viia hiliselt replitseeruvasse genoomi piirkonda. Kõikide ARS607 Fkh-mutantide ajastus on HU arrestis DNA suhtelist koopiaarvu muutust arvestades aga hiline (Joonis 11). Sellest võib järeldada, et Fkh1/2

seondumiskohtade omavaheline kaugus on varajaste replikatsiooni alguspunktide Fkh-aktivatsiooni toimumiseks kriitiline.



**Joonis 11. Erinevate ARS607 variantide DNA replitseerumine HU-arrestitud rakkudes.** Graafikul on koos esitatud erinevate tüvede *VPS13* lookuses paiknevate erinevate ARS607 variantide koopiaarvu muutus ajas, ARS501 suhtes, pärast G1-arrestist lahtilaskmist.

## 2.4 Arutelu

Eukarüootides laetakse DNA replikatsiooni initsiatsioonil G1-faasi lõpuks kõikidele *origin*'idele pre-replikatiivne kompleks. Selle aktiveerimine toimub erinevate alguspunktide puhul aga erineva sageduse ja ajastusega. Pagaripärmis on replikatsiooni alguspunktide paiknemine kromosoomidel üle kogu genoomi kaardistatud ning nende efektiivsus ja ajastus välja selgitatud (Raghuraman et al., 2001). Pre-RC aktiveerimisel seondub *origin*'idega kindlas järjekorras palju erinevaid replikatsioonifaktoreid. Mitmete pre-RC-d aktiveerivate faktorite hulk on aga võrreldes replikatsiooni alguspunktide arvuga väikesem. See on oluliseks põhjenduseks, miks kõiki alguspunkte ei saa aktiveerida üheaegselt (Mantiero et al., 2011; Tanaka et al., 2011).

Suures osas määrab replikatsiooni alguspunktide ajastuse neid ümbritsev kromatiini struktuur. *Origin*'ide afiinsust replikatsioonifaktorite suhtes võib mõjutada ka teatud transkriptsioonifaktorite seondumine nende ACSi lähedusse. Ühed *origin*'ide varajast ajastust

määravad transkriptsioonifaktorid on Forkhead1/2 valgud (Knott et al., 2012). Pre-RC aktivatsiooniks olulised limiteerivas koguses Sld3 ja Cdc45 seonduvad varajaste *origin*'idega juba G1-faasis. Forkhead faktorite deleteerimise abil on näidatud, et Cdc45 varajane sidumine on Fkh-sõltuv protsess (Knott et al., 2012). On leitud, et Forkhead valgud mõjutavad enamiku *origin*'ide ajastust, kas otseselt või kaudselt. Põhiliselt osaleb replikatsiooni kontrollis Forkhead1 (Knott et al., 2012; Ostrow et al., 2014). Järelikult on replikatsiooni alguspunktide ajalise regulatsiooni mõistmiseks oluline teada Forkhead1 *origin*'idega seondumise tingimusi ning selle funktsiooni.

Käesolevas töös leiti, et Forkhead1 sidumiseks G1-faasis on oluline funktsionaalne ACS järjestus Fkh1/2 konsensusjärjestuste läheduses. Töös kasutatud ARS305 on efektiivne ja varajane pagaripärmi replikatsiooni alguspunkt ning selle ajastus sõltub Fkh1 valgust (Knott et al., 2012; Lööke et al., 2013). Kui ARS305 ACS element on muteeritud, langeb *origin*'i võime Fkh1 siduda, vaatamata sellele, et Fkh konsensusjärjestused on muteerimata (Joonis 5). *Origin*'ide ACS järjestusega seondub ORC kompleks ning see on eelduseks kogu järgneva replikatsioonikompleksi moodustumiseks (Bell & Stillman, 1992). Kui ACS on muteeritud ja ORC sellega ei seonu, jäävad sidumata ka kõik teised replikatsioonifaktorid, muuhulgas ka Fkh1. See annab alust arvata, et Fkh1 sidumiseks *origin*'ide piirkonnas on vajalik selle interaktsioon mõne teise replikatsioonil osaleva valguga. Kuna Fkh1 seondub *origin*'idega juba G1-faasis, peaks Fkh1 interaktsioonipartneriks olema mõni pre-RC komponent, näiteks MCM kompleks. Sel viisil võibki avalduda Fkh1 roll replikatsiooni alguspunktide varajase ajastuse määramises: Fkh1 interakteerub G1-faasis pre-RC-ga ning muudab selle limiteerivate faktorite suhtes afiinseks, aidates Cdc45 *origin*'idele laadida.

Kindlalt reguleeritud replikatsiooni alguspunktide kasutus on ühelt poolt vajalik kiireks, täpseks ja täielikuks genoomi kahekordistumiseks. Kaudselt on replikatsiooni ajastus seotud aga ka geeniregulatsiooniga. Nimelt mõjutavad nii transkriptsioonil kui ka replikatsioonil osalevad valgud kromatiini struktuuri ning DNA kättesaadavus paistab olevat mõlema protsessi toimumiseks võtmetegur. On teada, et replikatsiooni alguspunktid paiknevad nukleosoomidest vabades alades ning ORC kompleksi seondumine on oluline ACSi ümbritsevate nukleosoomide positsioneerimiseks (Eaton et al., 2010; Lipford & Bell, 2001). Järelikult on võimalik, et muteeritud ACS järjestusega ARS305 ei sidunud Forkhead1 hoopis seetõttu, et selle looduslikud seondumiskohad olid nukleosoomidega kaetud ning ligipääs nendele oli raskendatud.

Forkhead1 seondumiseks replikatsiooni alguspunktidega on vajalik vähemalt kahe Fkh1/2 konsensusjärjestuse esinemine ACSi läheduses. Samuti on leitud, et Fkh-konsensususte omavaheline kaugus on mitmete varajaste replikatsiooni alguspunktide puhul sarnane (Lööke et al., 2013). Käesolevas töös leiti, et kui muuta Fkh-sõltuva varajase ARS607 järjestuses Fkh1/2 konsensususte paiknemist, takistab see enamikul juhtudel Fkh1 seondumist (Joonis 8). ARS607 puhul kattub ühe Fkh-konsensususe järjestus ACSiga ning selle muteerimine rikuks *origin*'i funktsionaalsuse. Seetõttu liigutati ACSis paiknevast Fkh1/2 konsensusjärjestusest 72 aluspaari eemal asetsevat Fkh seondumiskohta nii lähemale kui kaugemale (Joonis 7). Katsetest selgus, et mutantne ARS607 Fkh10, mille Fkh-konsensususte vahe on 10 aluspaari, seob Forkhead1 valku sama tugevusega kui ARS607 *wild-type* järjestusega alguspunkt. Kõikide teiste ARS607 variantide puhul langes Fkh1 seondumine samale tasemele, kui ARS607 mutandil, mis sisaldab vaid ühte Forkhead faktorite seondumiskohta (607\_B3mut) (Joonis 8). Kuna nihutatud Fkh-saitidega mutantides on kaks Fkh1/2 seondumiskohta olemas, võib järeldada, et konsensusjärjestuste omavaheline kaugus on Forkhead1 efektiivseks sidumiseks küllaltki täpselt kindlaks määratud. Pagaripärmi Fkh1/2 faktorite struktuuri analüüsides on välja pakutud, et need võivad funktsionaalsuse saavutamiseks omavahel dimeere moodustada. Arvatakse, et dimeerid võivad moodustuda erinevate *origin*'idega seotud Fkh faktorite vahel ning sellega soodustatakse varajaste replikatsiooni alguspunktide klasterdumist üksteise lähedale. Mitme *origin*'i kokkutoomise eelduseks on rohkem kui ühe Fkh seondumiskoha esinemine nende järjestuses (Aparicio et al., 2013; Knott et al., 2012). Samas võivad dimeerid moodustuda ka kahe ühe ja sama replikatsiooni alguspunktiga seonduva Forkhead1 valgu vahel. Võimalik, et Fkh-saitide nihutamisega tekitasime olukorra, kus dimeer ei moodustu ja Forkhead1 seondumine on seetõttu vähem stabiilne.

Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelise kauguse muutmise tõttu muutusid kõik töös kasutatud ARS607 mutantsed *origin*'id hiliselt replitseeruvaks. See näitab, et Forkhead1 seondumiskohtade kindel positsioon mängib replikatsiooni alguspunkti varajase ajastuse määramisel tähtsat rolli. Huvitav on asjaolu, et kuigi ARS607 Fkh10 mutant seob G1-faasis Forkhead1 valku sarnaselt metsiktüüpi *origin*'iga (Joonis 8), ei ole see alguspunkt enam varajane (Joonis 11). See tähendab, et Fkh1 sidumine ei kindlusta automaatselt *origin*'i varajast aktivatsiooni. Seda kinnitavad ka ülegenoomsed Forkhead faktorite seondumist kirjeldavad uuringud, mis tuvastasid Forkhead1 seondumise mitmete Fkh-sõltumatute *origin*'idega (Ostrow et al., 2014). Samas on ARS607 ajastus looduslikult Forkhead1 aktivatsioonist sõltuv. Seega vajab ARS607 Fkh10 mutandi aktivatsiooniaja muutus edasist

uurimist ja täpsemat määramist näiteks rakkude S-faasi sisenemisel Cdc45 seondumist jälgides.

Fkh1/2 seondumiskohtade ACSi läheduses ja seejuures nukleosoomidest vabas alas paiknemine soodustab Forkhead faktorite sidumist. Teistpidi võib Forkhead faktorite sidumine kindlatesse positsioonidesse mängida rolli nukleosoomidest vaba ala säilitamises või *origin*'i ümbritsevate nukleosoomide paigutumises. On leitud, et varajaste replikatsiooni alguspunktide NDR on mõnevõrra laiem, kui hilistel *origin*'idel ning see võiks olla alguspunktide erineva ajastuse põhjustajaks (Soriano et al., 2014). Võimalik, et Fkh-saitide nihutamisega muutus *origin*'ide ACS järjestust ümbritsevate nukleosoomide paiknemise muster. See selgitaks, miks ARS607 Fkh10 *origin* Forkhead1 valku seob, kuid varajaselt ei aktiveeru (Joonis 8, Joonis 11): ACS säilitab nukleosoomidest vaba ala, Fkh1 sidumine stabiliseeritakse mõne pre-RC valgu poolt, kuid ACSi ümbritsevad nukleosoomid paiknevad nüüd teineteisele lähemal ja NDR ei ole piisavalt lai, et *origin* oleks võrreldes teiste alguspunktidega limiteerivate replikatsioonifaktorite sidumises eelisseisus.

Replikatsiooni alguspunktide ajaline kontroll on mitmekülgne protsess, mille tähtsus avaldub nii S-faasi jooksul genoomi stabiilsuse säilitamises kui ka genoomi epigeneetilises kontrollis. Forkhead transkriptsioonifaktorite olulisust replikatsiooni ajastuse määramises on küll tõendatud, kuid nende toimemehhanism ning *origin*'idega seondumise tingimused vajavad veel selgitamist. Käesolevas töös kinnitati, et Fkh1 sidumiseks ja *origin*'ide varajase ajastuse säilitamiseks ei ole oluline mitte ainult kahe konsensusjärjestuse olemasolu, vaid tähtis on ka nende omavaheline kaugus. Peale selle on Forkhead1 sidumiseks vajalik konsensusjärjestuste läheduses asuv funktsionaalne ACS järjestus. Järelikult on Forkhead1 sidumine G1-faasis sõltuv *origin*'i funktsionaalsusest ning *origin*'i ajastus sõltuv Forkhead1 sidumisest õigetesse positsioonidesse.

## KOKKUVÕTE

Eukarüootide DNA replikatsiooni alguspunkte aktiveeritakse rakutsükli S-faasi jooksul erinevatel aegadel. *Origin*'ide ajalises regulatsioonis on määravaks teguriks nende asukoht genoomis, täpsemalt neid ümbritsev kromatiini struktuur. Mõnede *origin*'ide ajastus on aga määratud otseselt nende nukleotiidse järjestuse poolt. On leitud, et teatud *origin*'ide varajase ajastuse kindlustab Forkhead1/2 transkriptsioonifaktorite seondumiskohtade esinemine ACSi läheduses. Käesolevas töös uuriti kahe varajase lokalisatsioonist sõltumatu pagaripärmi replikatsiooni alguspunkti abil, kuidas mõjutab ACS järjestus Forkhead1 sidumist G1-faasis ning kas Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavaheline kaugus on Fkh1 sidumiseks ja *origin*'ide ajastuse määramiseks oluline.

Töö tulemustest selgus, et funktsionaalne ACS element Fkh konsensusjärjestuste läheduses on Forkhead1 valgu sidumiseks vajalik. Kui ARS305 ACS järjestuses muteeriti kaks nukleotiidi (TT->GG), langes oluliselt *origin*'i võime Forkhead1 siduda. Tulemus on märkimisväärne, kuna Fkh1/2 seondumiskohad paiknesid modifitseeritud ARS305\_ACSmut *origin*'is looduslikult. Järelikult sõltub Forkhead1 sidumine replikatsiooni alguspunktidega funktsionaalsest ACS järjestusest.

Muutes ARS607 ACSi läheduses paiknevate Fkh1/2 konsensusjärjestuste omavahelist kaugust, ilmnes, et distants kahe Fkh seondumiskoha vahel ei saa olla juhuslik. Nimelt langes enamike ARS607 Fkh-mutantide Fkh1 sidumise määr sarnasele tasemele kui ARS607\_B3 mutandi puhul, mis sisaldab ainult ühte Fkh-saiti. Ainult ARS607 Fkh10 *origin*, mille puhul on kahe Fkh-konsensuse vahemaa vaid 10 aluspaari, sidus Forkhead1 valgu samal tasemel kui *wild-type* järjestusega ARS607 (607\_wt).

Peale selle, mitte ühegi konstrueeritud ARS607 Fkh-mutandi ajastus ei püsinud varajane. Kuigi ARS607 Fkh10 *origin* Forkhead1 seob, ei avaldu valgu roll replikatsiooni ajastuse määramises. See tähendab, et Fkh1/2 konsensusjärjestuste kindlal positsioonil paiknemine on ARS607 varajase ajastuse määramisel kriitiline.

# **The role of DNA replication origin sequence elements in recruitment of Forkhead1 protein and replication timing**

Kristiina Jalakas

## **SUMMARY**

Cell division is an essential process for life, allowing an organism to grow, proliferate and procreate. Before a cell divides, it must make a complete copy of its genetic information so that it can be equally distributed between the progeny cells at the time of mitosis. The process is called DNA replication and it forms the basis for biological inheritance both in prokaryotes and eukaryotes. In eukaryotic cells, replication starts from multiple chromosomal elements distributed all over the genome, named replication origins. These genomic sites coordinate the ordered assembly of multiprotein complexes, which eventually leads to the formation of two replication forks at each origin.

Eukaryotic replication initiation is divided into two distinct steps: origin licensing and activation. Not all of the licensed origins are activated in every cell cycle. What is more, replication origins are activated at different times during the S-phase, with some origins firing on average earlier (early-firing origins) and others later (late-firing origins).

*Saccharomyces cerevisiae* has served as an efficient model system to study the initiation of DNA replication, since the origins exist as short, well-defined sites, named autonomously replicating sequences (ARS). Both a specific timing of activation and firing efficiency in a cell population has been defined for all ARS elements. However, the reason and molecular basis for such temporal regulation is poorly understood. It has been suggested that the timing program of origins is strongly affected by the limiting levels of key initiation factors, chromatin structure and the binding of certain transcription factors near the origins.

Forkhead1/2 factors have been well known to control the expression of a cluster of genes in the G2/M phase of the mitotic cell cycle. Recently it has been shown that the Forkhead transcription factors are also global determinants of replication origin timing in budding yeast, whereas the contribution to regulating origin timing is independent of the role in transcriptional control. Fkh2 plays the lead role in transcriptional regulation and Fkh1 in origin timing. In this study, the sequence elements required for the binding of Forkhead1 transcription factor at the origins were under investigation. First, we studied the role of the ARS consensus sequence (ACS) in the



binding of Forkhead1. Second, we investigated the importance of the distance between two Forkhead binding sites in regulating Forkhead1 binding and origin timing.

The results of this work indicated that a functional ACS element is required for Forkhead1 binding in G1-phase. Furthermore, we argue that the distance between two Fkh binding sites is of great importance for Forkhead1 binding and origin timing regulation. Changing the distance between two Forkhead consensus sequences resulted in low Forkhead1 binding at nearly all the modified origins and late timing of all the constructs. We propose that the changes in Forkhead1 binding and origin timing in modified ARS305 and ARS607 may result from disruption of different protein-protein interactions (Fkh1 - pre-RC components; Fkh1 – Fkh1) or alterations in the conserved nucleosome positioning around the ACS. However, these suggestions need further confirmation.

The findings presented in this work provide a clearer understanding of the sequence dependency for the binding of Forkhead1 factors at replication origins and its effect on origin timing. All in all, it gives new insight into the complex temporal regulation of DNA replication origin firing.

## **TÄNUSÕNAD**

Täna oma juhendajaid Arnold Kristjuhanit ja Marko Lõokest heade mõtete ja meeldiva juhendamise eest. Suur tänu Dmitri Lubenetsile läbivoolutsütomeetria analüüside teostamise eest. Aitäh tervele kromatiini uurimisrühmale ja rakubioloogia õppetoolile.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Alvino, G. M., Collingwood, D., Murphy, J. M., Delrow, J., Brewer, B. J. & Raghuraman, M. K. (2007). Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18): 6396-6406.
- Aparicio, J. G., Viggiani, C. J., Gibson, D. G. & Aparicio, O. M. (2004) The Rpd3-Sin3 histone deacetylase regulates replication timing and enables intra-S origin control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 24(11): 4769-4780.
- Aparicio, O. M. (2013). Location, location, location: it's all in the timing for replication origins. *Genes & Development*, 27(2): 117-128.
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M. & Bell, S. P. (1997). Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*, 91(1): 59–69.
- Badis, G., Chan, E. T., van Bakel, H. et al. (2008). A library of yeast transcription factor motifs reveals a widespread function for Rsc3 in targeting nucleosome exclusion at promoters. *Molecular Cell*, 32(6): 878-887.
- Bell, S. P. & Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71: 333-374.
- Bell, S. P. & Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, 357(6374): 128-134.
- Blow, J. J. & Ge, X. Q. (2009). A model for DNA replication showing how dormant origins safeguard against replication fork failure. *EMBO Reports* 10(4): 406-412.
- Bochman, M. L. & Schwacha, A. (2008). The Mcm2-7 complex has in vitro helicase activity. *Molecular Cell*, 31(2): 287–93.
- Bruck, I. & Kaplan, D. L. (2014). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes Mcm2-7 ring opening to allow for single-stranded DNA extrusion and helicase assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(2): 1210-1221.

- Celniker, S. E., Sweder, K., Srienc, F., Bailey, J. E. & Campbell, J. L. (1984). Deletion mutations affecting autonomously replicating sequence ARS1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 4(11): 2466-2466.
- Chang, F., May, C. D., Hoggard, T., Miller, J., Fox, C. A., & Weinreich, M. (2011). High-resolution analysis of four efficient yeast replication origins reveals new insights into the ORC and putative MCM binding elements. *Nucleic Acids Research*, 39(15): 6523-6535.
- Chen, Z., Speck, C., Wendel, P., Tang, C., Stillman, B., & Li, H. (2008). The architecture of the DNA replication origin recognition complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30):10326-10331.
- Dhar, M. K., Sehgal, S., & Kaul, S. (2012). Structure, replication efficiency and fragility of yeast ARS elements. *Research in Microbiology*, 163(4): 243-253.
- Dhingra, N., Bruck, I., Smith, S., Ning, B. & Kaplan, D. L. (2015). Dpb11 protein helps control assembly of the Cdc45·Mcm2-7·GINS replication fork helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(12): 7586-7601.
- Diffley, J. F. & Stillman, B. (1988). Purification of a yeast protein that binds to origins of DNA replication and a transcriptional silencer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(7): 2120-2124.
- Dubey, D. D., Davis, L. R., Greenfeder, S. A., Ong, L. Y., Zhu, J. G., Broach, J. R., Newlon, C. S. & Huberman, J. A. (1991). Evidence suggesting that the ARS elements associated with silencers of the yeast mating-type locus HML do not function as chromosomal DNA replication origins. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10):5346–5355.
- Eaton, M. L., Galani, K., Kang, S., Bell, S. P., & Macalpine, D. M. (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes & Development*, 24(8): 748-753.
- Ferguson, B. M. & Fangman, W. L. (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell*, 68(2): 333–339.
- Fraser, H. B. (2013). Cell-cycle regulated transcription associates with DNA replication timing in yeast and human. *Genome Biology*, 14(10): R111.
- Friedman, K. L., Brewer, B. J. & Fangman, W. L. (1997). Replication profile of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI. *Genes to Cells*, 2(11): 667–678.

- Friedman, K. L., Diller, J. D., Ferguson, B. M., Nyland, S. V., Brewer, B. J. & Fangman, W. L. (1996). Multiple determinants controlling activation of yeast replication origins late in S phase. *Genes & Development*, 10(13): 1595-1607.
- Frigola, J., Remus, D., Mehanna, A. & Diffley, J. F. (2013). ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature*, 495(7441): 339-343.
- Huang, R. Y. & Kowalski, D. (1993). A DNA unwinding element and an ARS consensus comprise a replication origin within a yeast chromosome. *The EMBO Journal*, 12(12): 4521-4531.
- Ibarra, A., Schwob, E. & Méndez, J. (2008). Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(26): 8956-8961.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J., & Botchan, M. R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Molecular Cell*, 37(2): 247-258.
- Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, a, & Araki, H. (2001). Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 20(8): 2097-2107.
- Karnani, N., Taylor, C., Malhotra, A. & Dutta, A. (2007). Pan-S replication patterns and chromosomal domains defined by genome-tiling arrays of ENCODE genomic areas. *Genome Research*, 17(6): 865-876.
- Klemm, R. D., Austin, R. J. & Bell, S. P. (1997). Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. *Cell*, 88(4): 493-502.
- Knott, S. R., Peace, J. M., Ostrow, A.Z., Gan, Y., Rex, A. E., Viggiani, C. J., Tavaré, S. & Aparicio, O. M. (2012). Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae*. *Cell*, 148(1-2): 99-111.
- Knott, S. R., Viggiani, C. J., Tavaré, S. & Aparicio, O. M. (2009). Genome-wide replication profiles indicate an expansive role for Rpd3L in regulating replication initiation timing or efficiency, and reveal genomic loci of Rpd3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Development*, 23(9): 1077–1090.

- Lee, D. G., & Bell, S. P. (1997). Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Molecular and Cellular Biology*, 17(12): 7159-7168.
- Lee, D. Y., Hayes, J.J. , Pruss, D. & Wolffe, A.P. (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72(1): 73–84.
- Lei, M., Kawasaki, Y. & Tye, B. K. (1996). Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9): 5081–90.
- Leonhardt, H., Rahn, H. P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D. & Cardoso, M. C. (2000). Dynamics of DNA replication factories in living cells. *The Journal of Cell Biology*, 149(2): 271-280.
- Lipford, J. R. & Bell, S. P. (2001). Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Molecular Cell*, 7(1): 21-30.
- Lööke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A. (2011). Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5): 325-328.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., Värvi, S. & Kristjuhan, A. (2013). Chromatin-dependent and -independent regulation of DNA replication origin activation in budding yeast. *EMBO Reports*, 14(2): 191-198.
- Mantiero, D., Mackenzie, A., Donaldson, A. & Zegerman, P. (2011). Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *The EMBO Journal*, 30(23): 4805–4814.
- Marahrens, Y. & Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*, 255(5046): 817-23.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., & Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annual Review of Biochemistry*, 79: 89-130.
- Meselson, M. & Stahl F. W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7): 671-682.

- Moyer, S. E., Lewis, P. W. & Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2–7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27): 10236-10241.
- Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M. & Murakami-Tonami, Y. (2010). Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell Cycle*, 9(16): 3233-3242.
- Nguyen, V. Q., Co, C. & Li, J. J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA rereplication through multiple mechanisms. *Nature*, 411(6841): 1068-1073.
- Nieduszynski, C. A., Knox, Y. & Donaldson, A. D. (2006). Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes & Development*, 20(14): 1874–1879.
- Piatti, S., Böhm, T., Cocker, J. H., Diffley J. F. & Nasmyth, K. (1996). Activation of S-phase-promoting CDKs in late G1 defines a "point of no return" after which Cdc6 synthesis cannot promote DNA replication in yeast. *Genes & Development*, 10(12): 1516-1531.
- Powell, S. K., MacAlpine, H., K., Prinz, J. A., Li, Y., Belsky J. A. & MacAlpine, D. M. (2015). Dynamic loading and redistribution of the Mcm2-7 helicase complex through the cell cycle. *The EMBO Journal*, 34(4): 531-543.
- Raghuraman, M. K., Winzeler, E. A., Collingwood, D., Hunt, S., Wodicka, L., Conway, A., Lockhart, D. J., Davis, R. W., Brewer B. J. & Fangman, W. L. (2001). Replication dynamics of the yeast genome. *Science*, 294(5540): 115-121.
- Randell, J. C., Bowers, J. L., Rodríguez, H. K. & Bell, S. P. (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. *Molecular Cell*, 21(1): 29-39.
- Rao, H. & Stillman, B. (1995). The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(6): 2224-2228.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P. & Diffley, J. F. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell*, 139(4): 719–730.

- Ricke, R. M. & Bielsky, A. K. (2004). Mcm10 regulates the stability and chromatin association of DNA polymerase- $\alpha$ . *Molecular Cell*, 16(2): 173-185.
- Santocanale, C., Sharma, K., & Diffley, J. F. (1999). Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast. *Genes & Development*, 13(18): 2360-2364.
- Sheu, Y. I. & Stillman, B. (2008). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4. *Nature*, 463(7277): 113-117.
- Siow, C. C., Nieduszynska, S. R., Müller, C. A. & Nieduszynski, C. A. (2012). OriDB, the DNA replication origin database updated and extended. *Nucleic Acids Research*, 40: D628-626)
- Soriano, I., Morafrail, E. C., Vázquez, E., Antequera, F. & Segurado, M. Different nucleosomal architectures at early and late replicating origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC genomics*, 15:791-805.
- Stinchcomb, D. T., Struhl, K. & Davis, R. W. (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, 282(5734): 39-43.
- Zhu., G., Spellman, P. T., Volpe, T., Brown, P. O., Botstein, D., Davis, T. N. & Futcher, B. (2000). Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature*, 406(6791): 90-94.
- Zou, L. & Stillman, B. (2000) Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclindependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 20(9): 3086-3096.
- Takahashi, M. (1987). A model for the spatio-temporal organization of DNA replication in mammalian cells. *Journal of Theoretical Biology*, 129(1): 91-115.
- Tanaka, S., Nakato, R., Katou, Y., Shirahige, K., & Araki, H. (2011). Origin association of Sld3, Sld7, and Cdc45 proteins is a key step for determination of origin-firing timing. *Current Biology*, 21(24), 2055-2063.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y. & Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125): 328–332.



- Theis, J. F. & Newlon, C. S. (1997). The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20): 10786-10791.
- Umek, R. M. & Kowalski, D. (1988). The ease of DNA unwinding as a determinant of initiation at yeast replication origins. *Cell* 52(4): 559–667.
- Van Houten, J. V. & Newlon, C. S. (1990). Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome III. *Molecular and Cellular Biology*, 10(8): 3917-3925.
- Venditti, P., Costanzo, G., Negri, R. & Camilloni, G. (1994). ABFI contributes to the chromatin organization of *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 B-domain. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1219(3): 677–689.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B.J. & Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Molecular Cell*, 10(5): 1223–1233.
- Watase, G., Takisawa, H. & Kanemaki, M. T. (2012). Mcm10 plays a role in functioning of the eukaryotic replicative DNA helicase, Cdc45-Mcm-GINS. *Current Biology*, 22(4): 343-349.
- Wyrick, J. J., Aparicio, J. G., Chen, T., Barnett, J. D., Jennings, E. G., Young, R. A., Bell, S. P. & Aparicio, O. M. (2001) Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science*, 294(5550): 2357-2360.
- Yabuki, N., Terashima, H., & Kitada, K. (2002). Mapping of early firing origins on a replication profile of budding yeast. *Genes to Cells*, 7(8): 781-789.
- Yang, S. C-H., Rhind, N. & Bechhoefer, J. (2010). Modeling genome-wide replication kinetics reveals a mechanism for regulation of replication timing. *Molecular Systems Biology*, 6: 404.
- Yeeles, J. T., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A. & Diffley, J. F. (2015). Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature*, 519(7544): 431-435.

# LISAD

## Lisa 1. Kasutatud pärmitüved

Tüvi	Genotüüp
baastüved	
W303	<i>ura3 leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>
AKY773	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-URA3</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
ARS607 katsed	
AKY791	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607wt</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY794	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_B3mut</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY901	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh10</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY902	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh30</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY903	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh60</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY904	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh90</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY905	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh120</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY906	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh150</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY907	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh180</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY908	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh240</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY909	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS607_Fkh300</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkh1::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>

ARS305 katsed	
AKY775	W303, MAT a, <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkhl::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY956	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS305_ACSmut</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkhl::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>
AKY992	W303, MAT a, <i>vps13::TRP1-GALprom-vps13_3kb-ARS305wt</i> , <i>cdc45::CDC45-3x1E2tag-spHIS5</i> , <i>fkhl::FKH1-3x3F12tag-natMX6</i> , <i>bar1Δ::hphMX6</i>

## **Lisa 2. Kromatiini immuunsadestamise katsete lahuste koostised**

### FA-lüüsipuhver

1 mM EDTA  
50 mM HEPES-KOH, pH 7,5  
140 mM NaCl  
0,1% Na-deoksükolaat  
1% Triton X-100

### Elueerimispuhver

10 mM EDTA  
200 mM NaCl  
1% SDS  
10 mM Tris-HCl, pH 7,5

### FA-500

1 mM EDTA  
50 mM HEPES-KOH, pH 7,5  
500 mM NaCl  
0,1% Na-deoksükolaat  
1% Triton X-100

### LiCl pesulahus

1 mM EDTA  
250 mM LiCl  
0,5% NP-40  
0,5% Na-deoksükolaat  
10 mM Tris-HCl, pH 8,0

### TES

1 mM EDTA  
100 mM NaCl  
10 mM Tris-HCl, pH 7,5

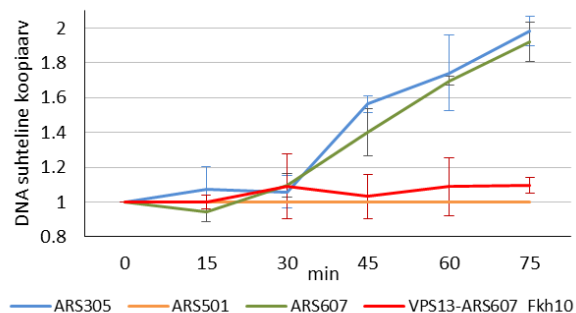
### Lisa 3. qPCR-il kasutatud praimerid

Nimi	Järjestus (5'-3')
ARS305_F	GCAGTGCTTGTAACCTGGTGC
ARS305_R	TAGTTATTACGGCGTCGGGC
ARS501_F	ATTGAGCATTACCTAACGCCATA
ARS501_R	TGGATCTGAAACCGAGCAGTT
ARS605_F	CTGCCCCCTATCAGTTAATGGCT
ARS605_R	ACCGTCAGAGGTTTAGAACTTGTAGA
ARS607up_F	AGGGATCCTTTGATTTGCTAGAT
ARS607up_R	TCACCACATTTGGAGAATGTACA
ARS607kj1_F	GGCTCGTGCATTAAGCTTGTA
ARS607kj1_R	CAATAGCAGGATCGACCTGACT
ARS737_F	TGCTTATTAAGGGTCTAGGACATTT
ARS737_R	ACTTTTGCTTAAGCGGCAGAAT
PAU1_F	TGGCCCAATACTACATGTTCCA
PAU1_R	GGGACACCGGTGATCATTCT
VPS3k_dist_F	TGATTCTATAAAGCTGGCAACGT
VPS3k_dist_R	CTAAATACCGAATCCCTGGAAAA

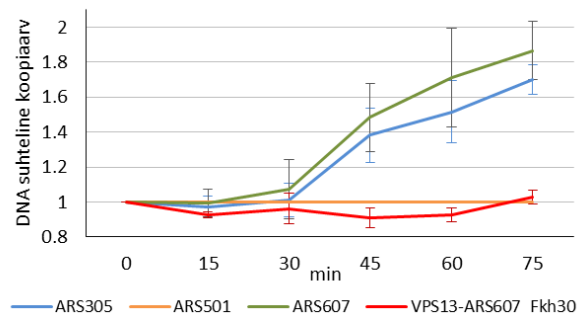
#### Lisa 4. DNA replitseerumine HU-arrestitud AKY901-AKY909 tüvede rakkudes

Graafikutel on välja toodud erinevaid ARS607 Fkh-mutante sisaldavate tüvede erinevate replikatsiooni alguspunktide koopiaarvu muutus ajas, ARS501 koopiaarvu suhtes, pärast G1-arrestist lahtilaskmist

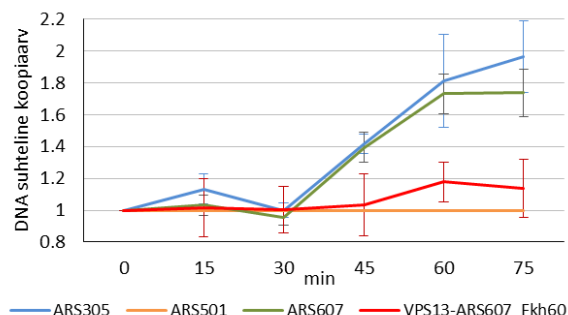
**AKY901**



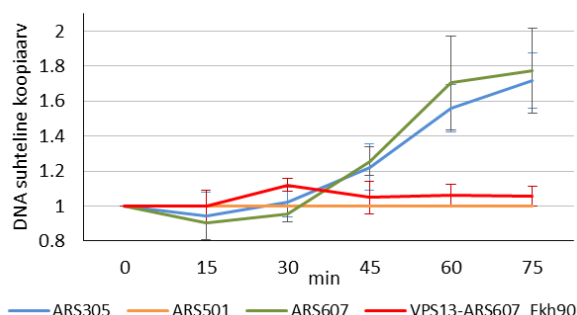
**AKY902**



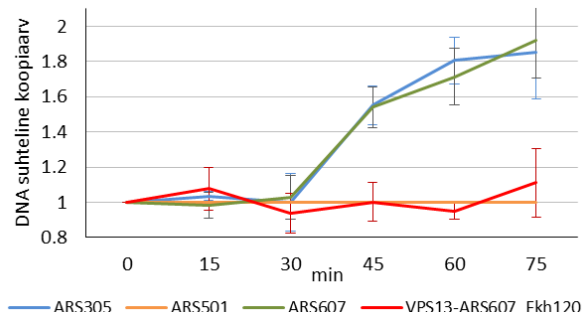
**AKY903**



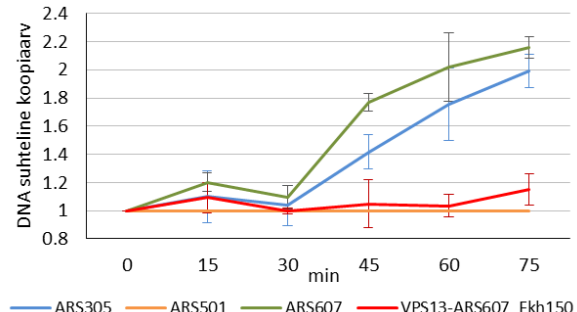
**AKY904**



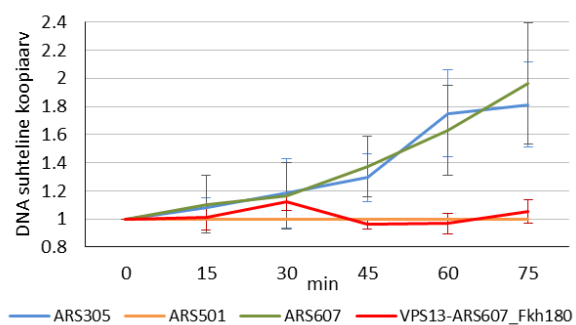
**AKY905**



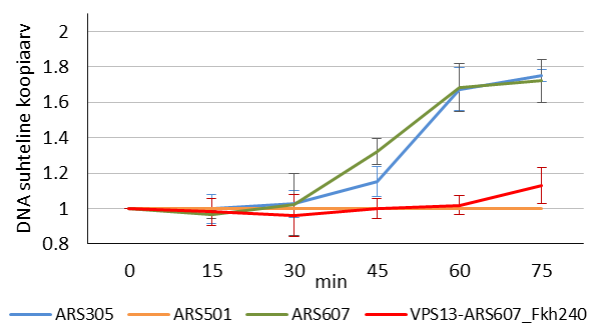
**AKY906**



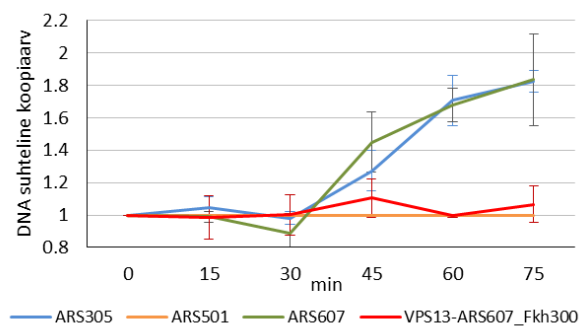
## AKY907



## AKY908



## AKY909



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Kristiina Jalakas

(sünnikuupäev:06.03.1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„Pagaripärmi DNA replikatsiooni alguspunktide järjestuselementide mõju Forkhead1 transkriptsioonifaktori seondumisele ja replikatsiooni alguspunktide ajastusele“,

Mille juhendajad on Arnold Kristjuhan ja Marko Lõoke,

- 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2015